

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
NMBU Veterinærhøgskolen
Institutt for produksjonsdyrmedisin
Seksjon for småforskning og husdyrhelse

Fordjupningsoppgåve 2020

Produksjonsdyr og mattryygghet

Infeksjonstidspunkt for *Fasciola hepatica* hjå lam i utvalde sauebesetningar på Sørvestlandet

Time of *Fasciola hepatica* Infection in Lambs in Selected Sheep Farms in the South West of Norway

Tor Olav Blekenberg, Karianna Laugaland og Julie Nedrebø Johannessen
Kull 2015

Vegleiarar Snorre Stuen, Lucy Robertsson og Kristoffer Tysnes

Innhold

Forord	4
Samandrag	5
Definisjonar og forkortingar	6
Innleiing	7
Bakgrunn for studie	7
<i>Fasciola hepatica</i>	9
Formål	23
Problemstilling	23
Materiale og metodar	24
Materiale	24
Prøvetaking og prøvetakingstidspunkt	25
Analyse av avføringsprøvar	26
Analyse av blodprøvar	27
Statistiske metodar	32
Resultat	33
Eggeljing	33
Serologi	33
Diskusjon	44
Betydning av funn	44
Tolking og vurdering av resultata	46
Metodeavgrensing	49
Beitebruk og behandling	52
Avgrensingar ved studiet	53
Faktorar som bidrar til variasjon i S/P%-verdien mellom flokkane	56

Vidare arbeid	57
Konklusjon	59
Takk til bidragsytarar	60
Summary	61
Referansar	62
Vedlegg 1 – S/P%-verdiar for sauер og lam i mai.....	67
Vedlegg 2 – S/P%-verdiar til lamma mai til august.....	70
Vedlegg 3 – Endring av status gjennom beitesesongen	72
Vedlegg 4 – kart over besetningane i prosjektet	73

Forord

Ved val av fordjupingsoppgåve ønskte me alle tre at den skulle innehalde praktisk arbeid innan småfemedisin. Dette fordi småfemedisin er noko me interesserer oss for, samt at det er noko me ser for oss vil vera nyttig i vårt framtidige arbeid som veterinærar i produksjonsdyrpraksis. Me kjem alle frå kommunar på Vestlandet med mykje sauahald og leveriktar er antatt å vera eit kronisk problem i fleire besetningar; Å ta utgangspunkt i besetningar frå våre heimkommunar for å undersøkje denne problematikken [store leverikteinfeksjon] blei difor ei moglegheit for oss til å bli betre kjent med sauedrifta i området [Sørvestlandet]. Samt auke kunnskapen vår om ein sjukdomstilstand som er høgst sannsynleg å møte på som produksjonsdyrpraktiserande veterinær.

Samandrag

Tittel: Infeksjonstidspunkt for *Fasciola hepatica* hjå lam i utvalde sauebesetningar på Sørvestlandet

English: Time of *Fasciola hepatica* Infection in Lambs in Selected Sheep Farms in the South West of Norway.

Forfattarar: Tor Olav Blekenberg, Karianna Laugaland og Julie Nedrebø Johannessen

Rettleiarar: Snorre Stuen, institutt for produksjonsdyrmedisin

Lucy Robertson og Kristoffer Tysnes, institutt for parakliniske fag

I dette prosjektet er det blitt tatt avføringsprøvar og blodprøvar frå sau og lam i 12 utvalde besetningar på Sørvestlandet. Blodprøvar tatt frå sauer (n=120) i mai og frå lam i mai (n=240) juni, juli og august (n=120) er blitt analysert for antistoff mot *Fasciola hepatica* ved bruk av ELISA. Avføringsprøvar frå lam er blitt analysert for leveriktegg i august og oktober.

Resultata frå blodprøvane viser at det blir overført antistoff mot *F. hepatica* med råmjølk frå sauen, som lamma har i minst 12 veker. Antistoffnivåa søkk utover sommaren før det i enkelte besetningar aukar igjen i juli og august. Dette som eit resultat av at lamma blir smitta på beitet og utviklar eigne antistoff mot *F. hepatica*.

Det blei ikkje påvist ikteegg i avføringsprøvane i august. I oktober blei det påvist i tre av besetningane.

Blodprøvar viser smitte tidlegare enn ein avføringsprøve gjer. Infeksjonstidspunkt varierer mellom dei ulike besetningane. Nokre lam har berre teikn til maternale antistoff gjennom prøvetakinga, mens andre berre viser teikn til eigne. Ein del lam har først maternale antistoff, og seinare eigenproduserte. Tidlegaste observasjon i auka antistoffverdi blei observert i juli (n=1), dei fleste i august (n=28).

Definisjonar og forkortingar

Cholangitt	Gallegangsbetennelse
CV	Coefficient of variation. Mål på spredning av resultat. CV=(standardavvik/gjennomsnitt)*100
Differensialdiagnose	Aktuell sjukdom for bestemte symptom hjå dyret
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – diagnostisk verktøy for å påvise t.d. antistoff i serum
Enterotoksemi	Bakteriell sjukdom der toksin produsert av bakteriar i tarm fører til alvorleg sjukdom hjå dyret
Feces	Avføring
FECRT	Fekal reduksjonstest (Engelsk: Fecal egg count reduction test)
Føreskrivingskaskaden	Rekkefølgje for korleis ein skal føreskrive legemidlar ut ifrå kva indikasjon legemiddelet har, og til kva for ein dyreart legemiddelet er marknadsført til.
Hepatitt	Leverbetennelse
Fjorlam	Fjarårslam, søyer født året før
Intermitterande eggutskiljing	Periodevis eggutskiljing, egg skiljast ut med (uvisse) mellomrom
Leverparenchym	Levervev
Prepatenstid	Tida frå infeksjon/smitte til egg blir skilt ut i avføring
Sedimentasjonstest	Diagnostisk verktøy for å påvise ikteegg i avføring
Sepsis	Blodforgiftning
USR	Utvida sjukdomsregistrering
Vena jugularis	Halsvenen

Innleiing

Bakgrunn for studie

Historikk

F. hepatica er ein kjent parasitt for norske sauehald. Parasitten er særleg omtalt til å vera eit problem langs kysten av Sør-Noreg, der ein ser sjukdommen fasciolose forårsaka av parasitten hjå fleire artar (Gjerde, 2011; Leverikter, 2017). Mest aktuelt er fasciolose hjå sau og storfe, og det var i desse områda [kystområda av Sør-Noreg] rapportert auka førekomst av fasciolose i tiåra fram mot 2011 (Sikveland & Søyland, 2011). Inntrykket frå produsentar i områda for vår studie [kommunar på Sørvestlandet] er at denne auken har fortsett også etter 2011.

Auka førekomst av fasciolose er òg beskrive i Storbritannia (Sargison, 2008) og Sverige (Novobilsky et al., 2012). I Storbritannia rapporterer dei om at dei ser fasciolose i områder ein tidlegare ikkje har observert sjukdommen. Auka førekomst og utbreiing av parasitten er noko ein set i samanheng med klimatiske tilhøve i form av auka temperaturar og nedbør, noko som gir gunstigare kår for parasitten til å få gjennomført livssyklusen sin. Sjølv om ein ikkje direkte kan overføre klimaførehalda i Storbritannia til Noreg, er utviklinga av vær og temperatur mot varmare og våtare klima noko ein ser i begge land (Hanssen-Bauer et al., 2009; Kendon et al., 2020).

På generell basis er smittepresset for *F. hepatica* beskrive til å vere høgast om hausten (Gjerde, 2011; Novobilsky et al., 2012). Spesielt er smittepresset høgt etter varme og våte somrar, noko som gir gunstige levekår for både *F. hepatica* og mellomverten, *Galba truncatula*. Allereie i 2011 vart det rapportert om tilfelle som beskrev at fasciolose vart observert tidlegare i beitesesongen enn kva ein før hadde antatt var mogeleg (Sikveland &

Søyland, 2011). Dette er bakgrunn for at det då vart skrive ei fordjupingsoppgåve om temaet ved seksjon for småforskning ved NMBU/NVH same året [2011] av Sikveland og Søyland.

Tidspunkt for infeksjon kan påverke val av behandlingsregime mot parasitten. Oppdatert kunnskap om dette er derfor svært nyttig for saueneringen for å kunne avgrense tap av tilvekst og påkjenning for dyra. Dette er viktig både med tanke på dyrevelferd og økonomi.

Når det gjelder behandling mot *F. hepatica* er det i dag lite å spele på. Det er i hovudsak to preparat som blir brukt mot parasitten til sau i Noreg, Fasinex® (triklabendazol) og Valbazen® (albendazol), men begge preparata har sine avgrensinger som påverkar kor gunstige dei er å bruke. Dette er i form av lang tilbakehaldstid for Fasinex®, og at Valbazen® berre har effekt mot vaksne iktar. Av desse to preparata er det berre Valbazen® som har marknadsføringstillating med indikasjon til sau i Noreg.

Det er gjort svært få studiar i forhold til *F. hepatica* og sau i Noreg. I 2011 skreiv Sikveland og Søyland oppgåva om diagnostikk og infeksjonstidspunkt for *F. hepatica* hos lam på Jæren. Der fann dei smitte (positiv ELISA-test for antistoff) hjå nokre lam i både juni og juli, men hovuddelen av lamma vart positive fra august og utover hausten. Dette, smitte fra og med seinsommar/tidleg haust (august og september), samsvarar med den tradisjonelle oppfatninga om smitte av leverikte. Dei [Sikveland og Søyland] presiserte at året dei utførte prøvetakinga vart prega av ein kald vinter og vår i førevegen, noko som ikkje favoriserer utvikling av iktar. Resultata deira er nødvendigvis ikkje representable for eit normalår utifrå tilbakemeldingane dei hadde fått med tanke på antatt smitte tidleg i beitesesongen. I studiet til Sikveland og Søyland blei ikkje mødrene til lamma testa for antistoff, og forhold med tanke på maternale antistoff overført fra søye til lam blei difor heller ikkje veklagt i stor grad.

Sidan studien til Sikveland og Søyland fann smitte hjå lam tidleg om sommaren, sjølv med eit klima som nødvendigvis ikkje låg til rette for det, og at det ikkje er gjort forsøk med overføring av maternale antistoff fra søye til lam er det av interesse å gjere ein ny studie i

forhold til diagnostikk og infeksjonstidspunkt av *F. hepatica* hjå lam. I dette studiet ynskjer me å finne ut kor tidleg me kan påvise at lam tek opp smitte av iktar, og om det er ein samanheng mellom antistoff hjå mor og lam med ein eventuell overføring av maternale antistoff. Prøvetakinga er lagt til flokkar med mistanke om leverikteproblem på Sør-Vestlandet, som er tenkt å vera ein av plassane der leverikte trivast best i Noreg.

Fasciola hepatica

Generelt

Fasciola hepatica, den store leverikten, er ein parasitt ein kan finne i fordøyningssystemet, då i hovudsak i lever og gallegangar. Den har stor betydning verda over og kan affisere mange pattedyr, deriblant menneske, men har i Noreg mest betydning innan småfe- og storfproduksjon. Den [*F. hepatica*] hører til parasittane i rekka *Platyhelminthes*, ofte kalla helmintar, i klassen trematodar. Trematodar blir ofte kjenneteikna som iktar og er parasittar som er flat i dorsale og ventrale aspekt, og har dermed ein bladliknande utsjånad makroskopisk. Dei fleste iktar er tvikjonna (hermafrodittiske) og har eit sett med både hokjønn- og hankjønnsorgan (Gjerde, 2011). Iktar kan både befrukta seg sjølv (sjølvbefrukting) og befrukta andre iktar (kryssbefrukting), og har difor store moglegheiter for rask formeiring.



Figur 1 Den store leverikten i lever hjå hjortekolle skote 11.11.2020 i området kor besetning D held til

Fasciola hepatica hører til i familien *Fasciolidae*, i ordenen *Echinostomida*, og er ein av dei mest kjende artane i slekta *Fasciola*. Den store leverikte er ein parasitt som førekjem på alle

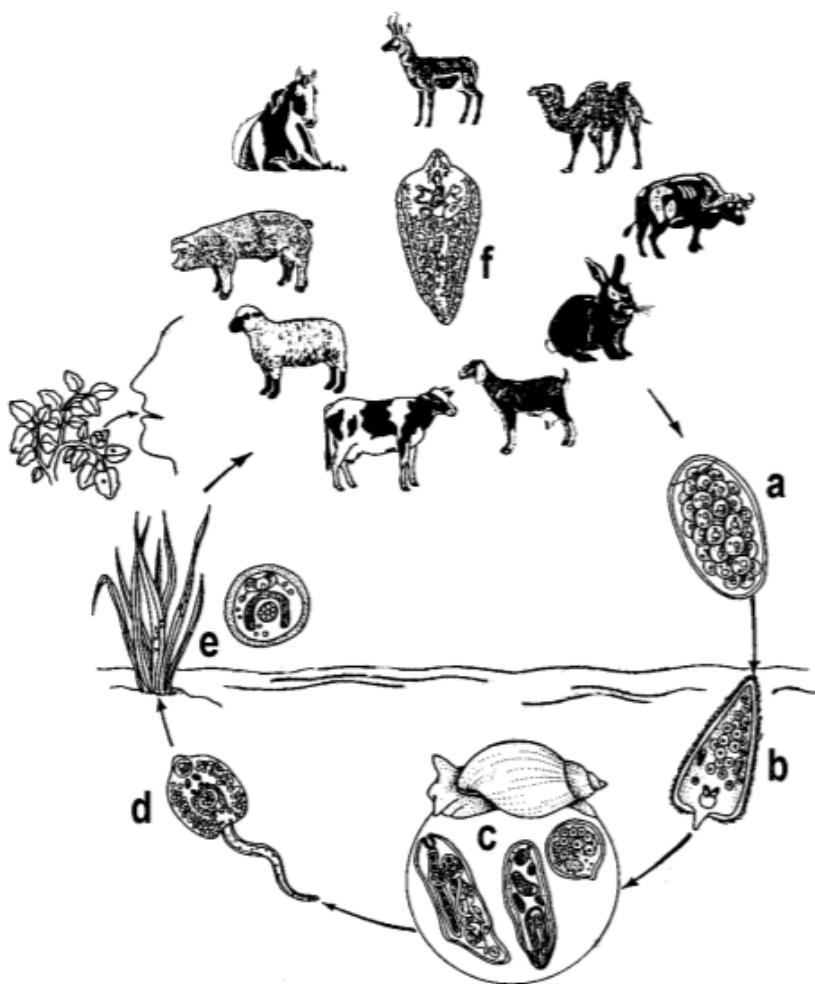
kontinenta forutan Antarktika (Fairweather et al., 2020), særleg i tempererte delar av verda og er ikkje uvanleg førekommen i Nord-Europa (Gjerde, 2011).

Iktar har alle ein indirekte livssyklus kor dei brukar ein eller fleire mellomvertar (MV) under utviklinga. For *F. hepatica* trengs det berre ein mellomvert - ei vatn-/damsnigle i familien *Lymnaeidae*, i slekta *Galba*. Denne mellomverten er nødvendig for at mellomstadiet miracidium kan foreta ei ukjønna formeiring. Den fullstendige utviklinga blir forklart seinare i oppgåva.

Ein anna parasitt i same slekta [*Fasciola*] som er verdt å nemna er *Fasciola gigantica*. Denne parasitten er meir vanleg hjå hovdyr i tropiske områder og er enno ikkje blitt påvist i Noreg. Denne parasitten er verdt å nemne då mykje av forskinga som er gjort er blitt gjort på denne arten. Både *F. hepatica* og *F. gigantica* er i gallegangane i levra. Hovudforskjellane mellom desse to artane av *Fasciola*, anna enn den geografiske utbreiinga, er storleiken. *F. gigantica* kan bli nærmere 76 mm lang medan *F. hepatica* kan nå 32mm i lengde (Gjerde, 2011). Dei har liknande livssyklus, men brukar ulike sniglar som mellomvert (Boray, 1966).

Parasittens livssyklus

Ein kjønnsmoden *F. hepatica* lev i gallegangane og produserer egg som, via gallen, går ut i tarm og ut med avføringa som eit uembryonert egg. Vidare embryonerer egget ved at det utviklar seg eit miracidium i kvart egg. Denne utviklinga skjer berre når temperaturen er 10 grader celsius eller meir. Jo varmare temperaturen er, jo raskare skjer utviklinga. Den raskaste utviklinga er sett mellom 22-26 gradar celsius, (Gjerde, 2011) då kan miracidiet utvikle seg på berre 9 dagar. Dette i kontrast til ein utvikling på 40 dagar ved ein temperatur på 15 grader celsius (Gjerde, 2011). I Australia er det sett at miracidium på sommarstid i gjennomsnitt utviklar seg på 21 dagar, mens det på våren og hausten, når temperaturen fell, vil det kunne ta opptil 90 dagar for det uembryonerte egget å utvikle seg til eit miracidium (Vaughan)



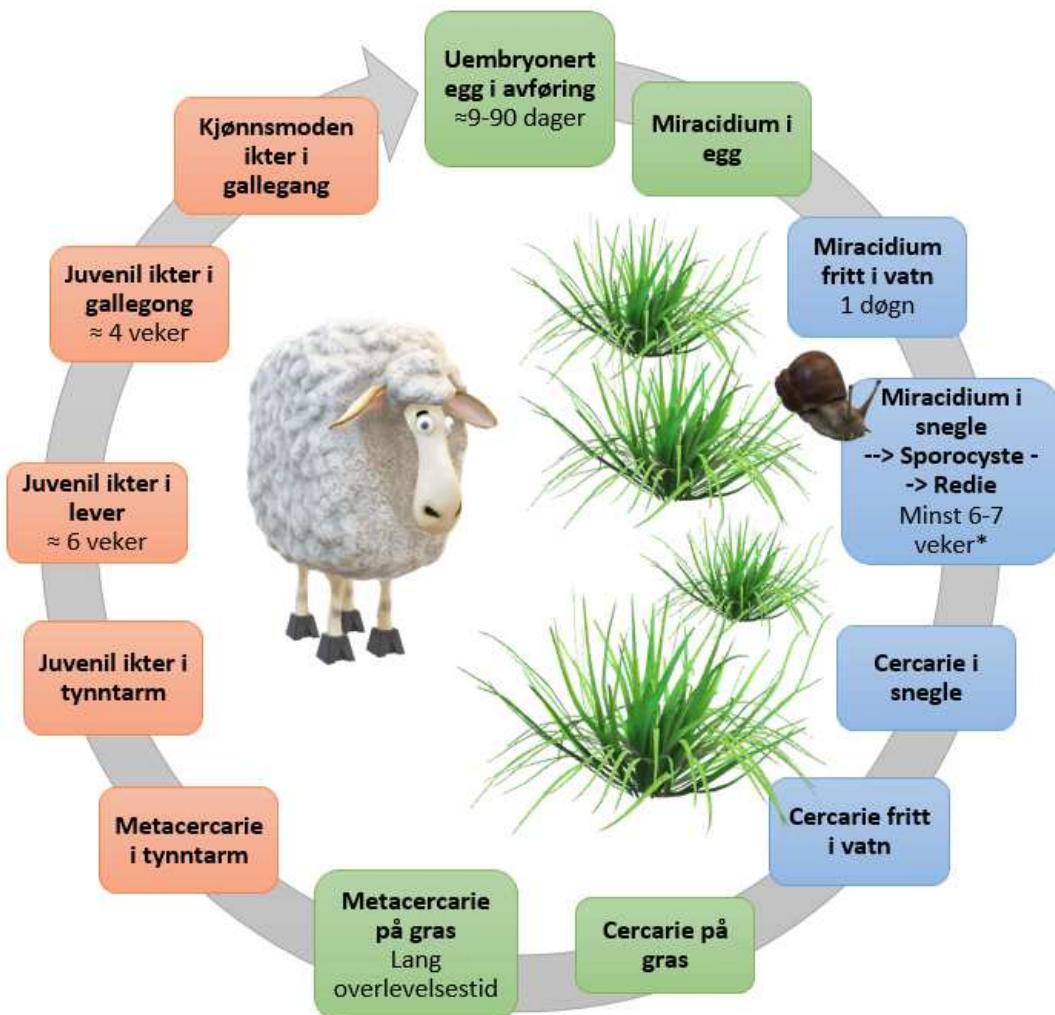
Figur 2 Viser livssyklusen til *F. hepatica*. Startar med at uembryonerte egg blir skilt ut i avføring (a). Egga embryonerar i fuktig miljø og ved rett temperatur og miracidiar bryt ut av eget (b). Miracidiet infiserer ein damsningel og vidare utviklar det seg fleire cercariar (c) som bryt ut av damsningelen og sym til gras (d). På graset kapslar dei seg inn til eit metacercarie (e) som blir eten av ein endevert. I endeverten utviklar metacercariet seg til ein kjønnsmoden leverikte (f) som produserer uembryonerte egg(Gjerde, 2011)

Vidare vil egg med miracidiet klekkje, men berre i ferskvatn og berre når miracidiet er blitt stimulert av lys. Miracidiet vil då symje for å finne ein damsningel den vil trengje seg inn i. Miracidiet er ikkje særleg motstandsdyktig i det fri og kan berre overleve i eit døgn før det må ha funne ein mellomvert (Vaughan). I damsningelen vil miracidiet utvikle seg til ein sporocyste. I denne sporocysta vil det skje ei ukjønna formeiring av kimceller kalla rediar, som til slutt kan ende opp som mange hundre til tusen cercariar frå berre eit miracidie. Denne

utviklinga er avhengig av ein døgntemperatur på minst 10 grader celsius og tar minst 6-7 veker, ofte meir (Boray & Love, 2017; Gjerde, 2011)

Cercariene bryt ut av snigla og sym rundt i vatnet før dei går opp i gras kor dei kapslar seg inn til ei cyste og blir til ein metacercarie. Dette stadiet i utviklinga er og avhengig av ein døgntemperatur på minst 10 grader celsius. Sjølve metacercariene er veldig resistente i fuktig miljø og kan bli verande på graset i lang tid om temperaturen er lågare enn 20 gradar celsius, men vil døy fort ut i eit tørt og for varmt klima (Vaughan). Cystane overlever òg kalde temperaturar, men truleg ikkje overvintring i norske forhold (Gjerde, 2011) og er då mest sannsynleg ikkje ein kjelde til smitte ved neste beitesesong.

Endeverten (EV) blir infisert av metacercariene ved at dei et graset metacercariene er kapsla inn på. I tynntarmen til EV blir metacercarien dekapsla og set fri det som no blir kalla ein juvenil ikte. Desse borar seg gjennom tynntarmveggen og ut i bukhola, kor dei etter omkring ein veke infiltrerer levra. I levra vandrar den juvenile ikten gjennom leverparenchymet i om lag 6 veker før den går til gallegangane og utviklar seg til ein kjønnsmoden ikte som sit i gallegangane, syg blod og produserer egg. Denne modninga, frå juvenil ikte til kjønnsmoden ikte, tek omkring 4 veker. Ein slik kjønnsmoden ikte kan ligge i gallegangane og produsere egg i fleire år, og produserer om lag mellom 20 000 til 50 000 egg kvar dag i lengre periodar (Boray & Love, 2017). Prepatenstida er omtalt til å vera i alle fall 7-8 veker hjå småfe, men truleg ofte nærmare 8-10 veker slik den er omtalt som hjå storfe (Boray & Love, 2017; Gjerde, 2011).



Figur 3 Livssyklus *F. hepatica* med tidsaspekt. * Ulike stadier i utviklinga kan overvintre i snigelen. Snigelen vil gå i dvale i løpet av vinteren, og fortsetje utviklinga på våren igjen - når døgntemperaturen er 10 grader celcius.

Utbreiing i Noreg

Den store leverikten finns i dei fleste delar av Noreg, men er særleg utbreidd på Sørvestlandet. (Domke et al., 2013; Gjerde, 2011). Ikte krev damsnigel som mellomvert og ein temperatur på minst 10 gradar celsius for å kunne gjennomføre fleire stadia av utviklinga si. Ikten føretrekk dermed lågland med eit våtare, mildare klima slik ein finn til dømes på Sørvestlandet, framfor kaldare klima i områdar høgare over havet og områder i dei meir nordlege delane av landet. *F. hepatica* er difor særleg eit problem på Sørvestlandet, men ein finn den [*F. hepatica*] langs heile kysten til Lofoten (Gjerde, 2011). Nord for Lofoten og i innlandet hevdar ein at ein sjeldan finn *F. hepatica*, då temperaturane ikkje er like passande

for utvikling av parasitten sjølv om ein kan finne damsniglar her. Grunna klimaendringar har ein internasjonalt sett ein aukande prevalens av infeksjon med *F. hepatica* og gjerne på stadar ein ikkje tidlegare har hatt parasitten (McMahon et al., 2016). Ein kan difor òg anta at det vil bli eit aukande problem i Noreg i tida framover.

Betydning hjå produksjonsdyr

Mange pattedyr kan vera endevert for den store leverikten, men grunna livssyklus finn me den for det meste hjå planteetarar. På verdsbasis er det antatt at fasciolose utgjer ein kostnad på om lag 2,5 milliardar dollar for husdyrnæringa (Jones et al., 2018) og antatt å vera eit aukande problem grunna global oppvarming.

I norsk husdyrproduksjon er det særleg hjå småfe og storfe ein kan finne *F. hepatica*. Hjå sau og storfe har ein tidlegare antatt at den har den avgrensa betydning for sjukdom, men ny forsking visar at parasitten påverkar det infiserte dyret meir enn kva ein før har veklagt.

Nokon studiar på storfe rapportera auka kalvingsinterval og forseinka pubertet (Charlier et al., 2007; López-Díaz et al., 1998). Ein kan tenkje seg at *F. hepatica* vil kunne gje dei same negative effektane på brunst hjå sau som hjå storfe, noko som vil kunne ha ein stor innverknad på produksjonen om det gjev forseinka brunst, og lamminga blir mindre konsentrert.

Det er antatt et det er lite til ingen utvikling av immunitet ved leverikeinfeksjon hjå småfe (Gjerde, 2011). Nokre studiar viser til at det blir utvikla noko immunitet hjå sau etter infeksjon av *F. hepatica* (Hillyer, 2005) og at ein eventuell vaksine kan vera eit godt alternativ til førebyggjande bruk av anthelmintika (Martínez-Fernández et al., 2004). I dag er det enno inga kommersiell vaksine tilgjengeleg mot leverikte. Dei einaste parasittane det er vaksine mot er lungeorm (Huskvac) og løpeorm (Barbervax) (Molina-Hernández et al., 2015). Om dyret utviklar lite til ingen immunitet betyr det at det ofte vil vere ein større infeksjon hjå eldre dyr enn hjå yngre, då det eldre dyr kan ha bygd seg opp ein større infeksjon etter fleire

smittetilfelle, over fleire år. Men, både akutte og kroniske infeksjonar kan bli observert i alle aldrar, og ein skal alltid vurdera *F. hepatica* som ein mogleg årsak (differensialdiagnose) i småfebesetningar kor ein opplev død, anemi eller därleg tilvekst og avmagring.

I Noreg er den store leverikten eit reelt problem i mange småfebesetningar, noko som har stor innverknad på produksjonen. Då det enno ikkje finst kommersielle vaksinar mot *F. hepatica* og effektiviteten rundt slike vaksinar er omdiskutert grunna antatt lav immunitet mot *F. hepatica* (Gjerde, 2011; Jones et al., 2018), er kontrolltiltaka mot *F. hepatica* i dei fleste buskaper i dag administrering av anthelmintika. Slik behandling utgjer ein økonomisk kostnad for produsentane og kan samtidig vera veldig tidkrevjande, i tillegg vil ein infeksjonen med *F. hepatica* utgjera ein generell påkjenning for dyret med innverknad på tilvekst og velferd.

Vårinfeksjon og haustinfeksjon

Den store leverikten er därleg til å overvinstre i beitene slik som mange andre beiteparasitar i Noreg klarar. Den er difor avhengig av å infisere mellomvert eller endevert før døgntemperaturen går under 10 grader celsius for å kunne overleve. I mellomverten, damsnielen, vil dei ulike stadia fram til og med cercariene kunne overleva i snielen til neste vår, når temperaturen stig over 10 grader igjen, og om snielen sjølv overlever vinteren (Love, 2017). Metacercariene, som er kapsla på gras, kan overleve temperaturar under 10 garder celsius (Valero & Mas-Coma, 2000), men vil truleg ikkje overleve over vinteren i norske forhold (Gjerde, 2011). Om dei overlev vinteren vil dei truleg ha liten innverknad på infeksjon tidleg på våren då dyra sjeldan et fjorgammalt gras på beitene (Gjerde, 2011).

I endeverten vil leverikten kunne utvikle seg uansett ytre temperatur, og ein kjønnsmoden leverikte kan leve og produsere egg i endeverten i mange år etter infeksjon. Ifølge forsking er det på bakgrunn av dette observert to hovudperioder for infeksjon; vårinfeksjon i mai til juni frå overvintra, infiserte sniglar, og vinterinfeksjon i august til september frå metacercarier som har utvikla seg i sniglar gjennom sommaren etter utskiljing av egg frå infiserte endevertar

etter beiteslepp (Novobilský et al., 2014). Kor stor betydning ein vårinfeksjon får kjem an på kor mange sniglar som overlev vinteren. Dette vil variere mellom ulike områder og frå sesong til sesong avhengig av klima (Constable et al., 2017). Samtidig vil utviklinga til varmare og mildare vintrar grunna global oppvarming vere til fordel for reproduksjon og overleving av *G. truncatula*. Dette vil då òg auka moglegheita for vårinfeksjon av *F. hepatica* frå overvintra larvar i sniglar og at ein ser infeksjon av endevert tidligare enn kva som har vore mogeleg før (Relf et al., 2011).

Kliniske teikn og sjukdomsforløp

I sauehald har infeksjon med *F. hepatica* stor innverknad på produksjonen og dyrevelferda (Munita et al., 2019b). Infeksjon av den store leverikten kan ha ulik påverknad og alvorsgrad ut ifrå kor mange metacercarier individet fekk i seg ved infeksjon. Sjukdom blir delt inn i akutt-, subakutt og kronisk fasciolose. Blir individet smitta med ekstremt mange metacercarier (over 2000stk) på kort tid vil den etter 2 til 6 veker kunne utvikla ein akutt fasciolose og dyret kan døy raskt utan sjukdomsteikn, ofte innan berre 1-2 dagar (Gjerde, 2011). Grunnen til død er som oftast den store, samtidige levervandringa av juvenile ikte som kan gje eit så omfattande blodtap at dyret dør raskt grunna blodmangel (Fiss et al., 2013). Symptom som kan bli observert kort tid før dyret dør er slappheit, bleike slimhinner, pusteproblem, buksmerter (Gjerde, 2011) og i nokre tilfelle ikterus (Boray & Love, 2017). Blir dyret smitta med noko færre (500-1500) metacercarier kan det utvikle seg ein subakutt fasciolose. Ved ein subakutt fasciolose vil skadane i levra vere dei same som ved akutt fasciolose, men av mindre omfang. Ein vil kunne sjå symptom som raskt fall i vekt, bleike slimhinner og ofte ikterus 6 til 10 veker etter infeksjon. Dyret blir anemisk og får hypoproteinemi. Utan behandling kan desse dyra òg døy (Fiss et al., 2013; Gjerde, 2011). Ved ein lågare infeksjon (mellom 200 til 500 metacercarier) vil dyret kunne utvikle ein kronisk fasciolose 4 til 5 månader etter infeksjon (Gjerde, 2011). Symptoma vil ofte ikkje

vere like påfallande som ved ein akutt eller subakutt fasciolose, og dyret dør sjeldan direkte av infeksjonen. Symptom som gradvis reduksjon i vekt og avmagring kan ein observer, men ofte ikkje meir enn dette. I nokre tilfelle kan ein sjå bleike slimhinner og ødemtilstandar, særleg ødem under haken. Sjølv om dei infiserte dyra ofte ikkje dør direkte av infeksjonen kan dei døy sekundært til dei ovannemnte symptomata. Sjukdom skjer i hovudsak grunna dei kjønnsmodne iktene i gallegangane som syg blod, og vil over tid gje en hypoproteinemi og gallegangsbetennelse (cholangitt) med eventuelle obstruksjonar av gallegangane (Fiss et al., 2013). Hjå desse dyra kan ein ofte påvise ein moderat mengde ikteegg i feces og ein vil post-mortem kunne sjå fortjukka, fibrotisk levervev samt fortjukka gallegangar. Ein vil som oftast kunne påvise vaksne iktar i gallegangane (Gjerde, 2011).

Ein kan sjå alle dei ulike forma for fasciolose hjå småfe, men den kroniske er vanlegast (Boray & Love, 2017). Då inkubasjonstida for dei ulike sjukdomsformene er ulik opptrer dei òg som oftast ved ulike tid/periodar på året. Den akutte forma, med kortast inkubasjonstid, ser ein som oftast på seinsommar (august-september), den subakutte forma på hausten (oktober til desember) og den kroniske forma ikkje før seinwinter eller tidleg vår (Gjerde, 2011).

Fasciolose fører ikkje alltid direkte til død, men er i nokon besetningar ei viktig årsak til produksjonstap. Infeksjon med den store leverikten kan føre til därleg tilvekst hjå lam, avmagring hjå sau, auka fare for mastitt (Munita et al., 2019b) og redusert lammingsprosent (Boray & Love, 2017). Det er i nokon studiar vist at leverskadane kan påverke tidleg direktigheit (Sargison & Scott, 2011) og at slike skadar òg er sett i samanheng med auka nivå av smørsyre (β -hydroksybutarat) i blodet som aukar fare for fosterforgifting (Fthenakis et al., 2015).

Differensialdiagnosar

Då kronisk fasciolose er den vanlegaste forma for fasciolose hjå sau, kor symptomata er relativt diffuse med redusert tilvekst, avmagring, anemi, redusert produksjon og i nokre tilfelle

ødemtilstandar og generelt redusert allmenntilstand, er infeksjon med *F. hepatica* ein sjukdom som kan likne mykje anna. Mineralmangel som mangel på kobolt er ein aktuell differensialdiagnosar (Constable et al., 2017) som kan gje anemi, redusert tilvekst og redusert allmenntilstand. Generelt därleg fôr og beiteforhald, og manglar ved management kan òg vera årsaka til dette. Andre innvortes parasittar, Johne's disease (paratuberkulose), intestinal adenokarsinom og andre årsaka til redusert opptak av næringsstoff er viktige differensialdiagnosar med tanke på avmagring (Constable et al., 2017).

For akutt fasciolose er årsaker til anemi, ikterus og plutselig død mogleg differensialdiagnosar. Viktig er infeksjon med *Haemonchus contortus*, infeksiøs nekrotisk hepatitt (Constable et al., 2017) og cholangitt av andre årsaker (Weisenberg, 2015) enterotoksemi og sepsis, eperythrozoonose (infeksjon med *Mycoplasma ovis*) (Neimark et al., 2004) og miltbrann (Constable et al., 2017).

Patologi

Dei patologiske forandringane ved ein infeksjon av *F. hepatica* er i hovudsak knytt til skadar i levra og gallegangane grunna juvenile- og kjønnsmodne iktar. Dette utviklar seg til ein hypoalbuminemi og ein anemi i individet som vidare vil kunne gje ødemtilstandar. Dei juvenile iktene i levra vandrar rundt i leverparenkymet, og skaper då direkte skade på levra i form av boregongar og tap av leverceller. Makroskopisk vil desse boregongane tidleg i infeksjonen sjå ut som nokre få kvite prikkar som etter kvart seinare i infeksjonen vil bli fleire i tal, innehalde koagulert blod og seinare bli faste (Rushton & Murray, 1977). Desse boregongane kan bli fylt med blod som kan lekkje ut i bukhola og i så fall føre til stort blodtap hjå individet. Etter kvart blir affiserte leverlappar mindre og fastare, gjerne med ein overflate beståande av små hol, på engelsk kalla "pitted surface" (Rushton & Murray, 1977), med adheranse til serosaoverflata. Etterkvart vil affiserte leverlappar bli fibrøse, medan leverlappar som ikkje er affisert blir forstørra. Levervandringa kan altså føre til ein direkte

leversvikt grunna øydelagde hepatocytar og eit enormt blodtap grunna øydelagd

leverparenchym, noko som i begge tilfella kan være livstruande.

Dei kjønnsmodne iktene i gallegongane sug blod og fører til ein hyperplastisk

betennelsestilstand i galleveggane (Gjerde, 2011) og etterkvart ein fibrose (Rushton &

Murray, 1977). Betennelsestilstanden fører til fortjukning av gallegangane samt

plasmaproteintap grunna inflamasjonsprosessar. Blir denne plasmaproteinlekkasjen stor vil

det kunne føre til ødemtilstandar i dyret, då osmolariteten i blodet blir direkte påverka av den

reduserte proteinmengda (Shah & Mandiga, 2020). I tillegg kan blodtapet bli stort om iktene

er mange og sug mykje blod, og dyret kan då bli anemisk.

Dei makroskopiske forandringane forklart over kan bli oppdaga på slakteriet, og skal bli

registrert gjennom USR-ordninga kor produsentane vil få tilbakemelding på om det er gjort

noko USR-funn (Tollersrud & Tømmerberg, 2017). Tilbakemelding frå slakteri har fram til

no vore eit viktig varslingssystem for mange saueprodusentar om at besetninga deira er

infisert av leveriktar.

Førebyggjande tiltak og behandling

I Noreg er det berre eit preparat mot *F. hepatica* med marknadstillating og indikasjon til sau,

Valbazen®. Dette inneholder verkemiddelet albendazol som verkar berre mot kjønnsmodne

iktar. Gjennom kunnskapen om leverikten sin livssyklus ser ein då at Valbazen® berre bør

brukast på vinteren om det skal ha en effekt på *F. hepatica*, då iktene før dette (sommar og

haust) som oftast ikkje har nådd det kjønnsmodne stadiet enda. Ein anna viktig eigenskap med

albendazol er at det òg verkar mot andre parasittar, som diverse rundormar og bendlorm.

Valbazen® er difor eit viktig verkemiddel mot fleire parasittar i beitesesongen.

Med tanke på behandling er det viktig å vera klar over at dosen som krevst for at Valbazen®

skal ha effekt mot den store leverikten er ulik den som er oppgitt for rundorm, kor dosa må

vera høgare skal den ha effekt på *F. hepatica*. Blir Valbazen® gitt i dosen angitt for rundorm

vil den altså ikkje ha effekt om målet er å behandla dei (kjønnsmodne) leveriktane – dette er ei viktig kjelde til feilbehandling.

Eit anna preparat som har marknadsføringstillating i Noreg på storfe er Distocur®. Dette preparatet inneheld oksyklozanid og har effekt mot vaksne stadier av leverikter, samt bendlormsegment i slekta *Moniezia*. Distocur® kan bli brukt til sau etter føreskrivingskaskaden, då det har rett indikasjon til ein annan art(Forskrift om bruk av legemidlar til dyr, 2017, §4). Då blir tilbakehaldningstida sett til 28 dagar. I andre land er det eit preparat godkjent til sau som inneheld oksyklozanid, Zanil®. Dette må ein òg ta inn på godkjenningsfritak om ein ynskjer å bruke det i staden for Valbazen® mot *F. hepatica* på sau. Fordelen med å bruka oksyklozanid i staden for albendazol, er at oksyklozanid er smalspektra og verkar hovudsakleg på leveriktar, i motsetning til albendazol som er breispektra og verkar på rundormar i tillegg (*Know Your Anthelmintics Groups*, 2020).

Eit anna preparat som blir brukt i Noreg mot *F. hepatica* er Fasinex®. Dette får ein på godkjenningsfritak og inneheld verkemiddelet triklabendazol. Fasinex® har 56 dagar tilbakehaldstid, noko som er betydeleg lenger enn Valbazen® som berre har 14 dagar. Fordelen med Fasinex® er at triklabendazol verkar mot alle leveriktarstadia og kan difor brukast òg på hausten eller ved sjukdom tidlegare i beitesesongen. Det at Fasinex® er einaste preparatet som har god effekt mot iktar i alle stadiar (Fairweather, 2011; Williams), er truleg årsaka til at Fasinex® blir brukt i staden for Valbazen og Distocur som begge kjem før Fasinex i føreskrivingskaskaden(Forskrift om bruk av legemidlar til dyr, 2017. §4).

Andre midlar som er tillat å bruke i Noreg mot *F. hepatica* er nitroksinil og closantel. Desse er oppført i tabell 1 i vedlegget til forordning (EU) nr. 37/2010 (Forskrift om legemiddelrester i næringsmidler fra dyr, 2012). Ingen preparat med desse verkemidlane har per i dag marknadstillating i Noreg og må då eventuelt tas inn på godkjenningsfritak. Det verkar til å

vera mindre vanleg å bruke desse midlane i Norge per i dag, men dei kan vera aktuelle i framtida om ein ser utvikling av resistens mot albendazol og/eller triklabendazol.

Dei viktigaste tiltaka mot den store leverikten er førebyggjande arbeid, då særleg tiltak på beite for å forhindre utvikling av larvar. Utviklinga krev damsningelen, som lev i gjørme og fuktige områder nære vatn (Gjerde, 2011). Tiltak for å redusere fuktige og gjørmete områder på beite er difor viktig. Slike førebyggjande tiltak kan vera effektiv drenering av beiter samt å gjerde inn fuktige områder kor ein ser for seg at damsningelen held til. Sjuke dyr som visar kliniske teikn på leverikteinfeksjon må sjølvsagt bli behandla. Slik dyr skal behandlast symptomatisk samt med eit anthelmintika som verkar mot den store leverikten, som i beitesesongen helst bør vera Fasinex® for at ein er sikker på at ein får tatt alle larvestadia.

Ved særleg sjukt dyr med dårlig prognose skal ein vurdera avliving som beste tiltak.

Vidare behandlingsregime i besetninga må vurderast på bakgrunn av historikk og sjukdomstilstanden i flokken, helst gjennom avføringsprøvar for påvising av leveriktegg. Korleis produsentane handterer eit leverikteproblem er heilt avgjerande for om dei klarar å ha kontroll på og førebyggje parasitten. Korleis dei stillar seg til resistensproblematikken er òg viktig då dette er et aukande problem internasjonalt (Fairweather et al., 2020). Opplev ein produsent at spesifikk behandling mot *F. hepatica* ikkje verkar bør produsenten kontakte veterinær for ein utgreiing. I slike tilfelle må ein gjennomgå rutinar rundt behandling for å utelukka eventuelle årsaker ved managementet som kan gje dårlig effekt av behandling, samt vurdera å utføre ein fekal reduksjonstest (FECRT) for å utelukka ein eventuell resistens i besetninga (Brockwell et al., 2014).

Resistensproblematikk

I Noreg er det mange stadar tradisjonelt blitt brukt anthelmintika i det førebyggjande arbeidet mot den store leverikten. Grunna meir kunnskap om og tilfelle av resistens mot slike middel internasjonalt er det ein fagleg einig om at anthelmintika skal brukast restriktivt, og berre når

ein har eit problem (Beesley et al., 2018). Behandlingsregime vil difor vere ulikt for ulike besetningar. Behandlingsregime skal vere på bakgrunn av tidlegare historie i besetningen og faktiske tilfelle av infeksjon, helst med påvising av ikteegg gjennom ein avføringsprøve (samleprøve frå besetningen), samt eventuelle sjukdomsutbrot i løpet av beitesesongen.

I store delar av verda er middel som inneholder triklabendazolar det mest vanlege og føretrekte anthelmintikaet mot den store leverikten (Beesley et al., 2018). I Noreg er ikkje midlar med triklabendazol marknadsført og vi har i hovudsak bruka albendazol mot *F. hepatica*. Det er i lang tid blitt påvist resistens hjå *F. hepatica* mot triklabendazoler (Fairweather et al., 2020), med den første publiserte artikkelen i 1995 (Overend & Bowen, 1995). Ein ser òg aukande tilfelle internasjonalt av resistens mot albendazolar (Fairweather et al., 2020), kor det blant anna for første gong ble sett og rapportert i Sverige i 2012 (Fairweather et al., 2020; Novobilský et al., 2016). Då ein ser aukande resistens internasjonalt og ein veit at albendazolresistens er til stade i Sverige, er det ikkje utenkeleg at ein slik resistens òg kan finnast i Noreg utan å ha blitt oppdaga. Med eit høgt forbruk av parasittmiddel vil moglegheita for utvikling av resistens vera høg. Med denne kunnskapen er difor reduksjon i og restriksjon av bruken av parasittmedel ein svært viktig tiltak for å minska sjansen for utvikling av resistens.

Formål

Føremålet i denne oppgåva er å undersøke kva som er tidlegaste infeksjonstidspunkt for *Fasciola hepatica*, den store leverikte, hjå lam i 12 utvalde sauebesetningar på Sørvestlandet. Ved hjelp av ein kommersiell ELISA-test og sedimentasjonstest ynsker me å påvise antistoff i serum og egg i feces i studieutvalet vårt.

I oppgåva vil me sjå korleis antistoffnivåa mot *F. hepatica* hjå lam i studieutvalet utviklar seg gjennom beitesesongen 2020. Resultat vil samanliknast med tilsvarande oppgåve frå 2011(Sikveland & Søyland, 2011) for å sjå om me kan påvise antistoff tidlegare. Me vil òg undersøke antistoffsstatus mot *F. hepatica* hos mødrene til lamma som inngår i studieutvalet ved starten av beitesesongen [mai]. Dette for å sjå om det kan påverke tidleg påvisning av antistoff i serum hos lamma grunna maternale antistoff.

Problemstilling

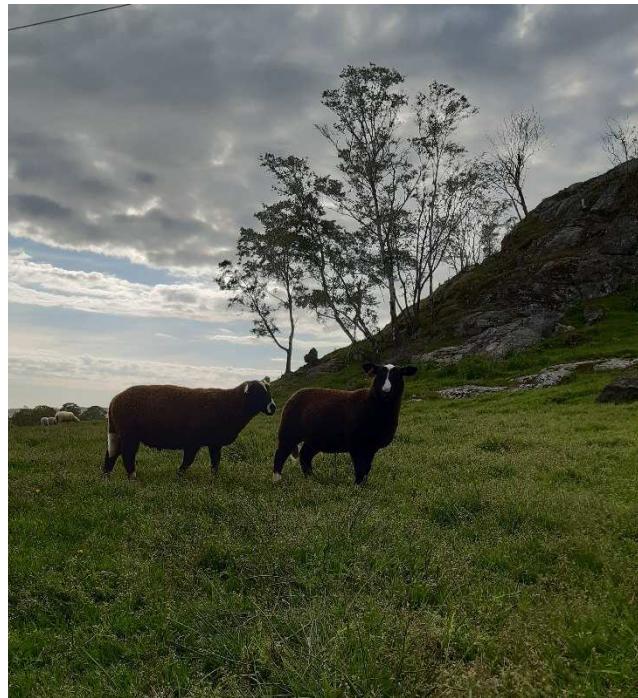
Korleis er antistoffnivåa mot *Fasciola hepatica* hjå lam gjennom beitesesongen og kva innverknad har maternale antistoff på desse?

Materiale og metodar

Materiale

Besetningane me har tatt prøvar hjå har me valt ut i dei 3 områda me studentar er frå, slik det kjem fram i vedlegg 4. Det blei valt ut 4 besetningar i kvart område.

Besetningane er blitt valt ut med bakgrunn i at det har vore mistanke om leveriktar i besetninga. For å kunne vera med i prosjektet måtte dei ha nok sau med lam som går på heimebeite gjennom sommaren, slik at det var mogleg å samle



Figur 4 Lam frå ei av besetningane i prosjektet

dei for prøvetaking gjennom heile prøvetakingsperioda. Til å finne desse besetningane har me brukt sauebønder me kjenner, spurt lokale veterinær om aktuelle besetningar og gått ut med informasjon om prosjektet i lokale Facebook-grupper der sauebønder er med.

Det er ulike grunnar til at det har vore mistanke om leveriktar i dei ulike besetningane. Det kan vere at ein kvart år får merknad om leverkassasjon på USR-rapport, hatt dyr med kliniske teikn på fasciolose eller det er blitt påvist leveriktar ved obduksjon av dyr som har døydd før ein har rukke å behandla dei.

Før første prøvetaking blei det bestemt kva for nokre lam og sau som skulle bli tatt prøve av i dei 12 besetningane. Fordjupingsstudent og bonde fann 10 sau med to lam kvar som skulle vere med på prøvetakinga. Ein prøvde å bruke lam som var født over så kort periode som mogleg. For å gjere det enklare og meir praktisk for bonden valte ein sau som gjekk på same beitet. I nokre få tilfelle var det nødvendig å ha med sau som gjekk med 3 lam for å få nok dyr til studieutvalet. Då blei to av dei 3 lamma valt ut tilfeldig.

Etter første prøvetaking hadde prosjektgruppa eit møte for å evaluere første runde med prøvetaking. Det blei då bestemt at ein skulle redusere kor mange lam som var med av omsyn til økonomi og arbeidsmengde. Vidare skulle ein berre ha med lamma til 5 av sauene, totalt 10 lam i kvar besetning. Desse blei valt ut tilfeldig, for eksempel etter bonden sitt ynskje eller dei 10 lågaste øyrenummera.

Prøvetaking og prøvetakingstidspunkt

Studiet er eit kohortstudie, med prøvar tatt ein gong i månaden frå mai til august i 2020.

Prøvane blei tatt i starten av den andre veka i kvar månad.

Ved kvar prøvetaking blei det tatt blodprøvar og avføringsprøvar av først 20 og seinare 10 lam i kvar besetning. Ved første prøvetaking blei det og tatt blodprøvar av dei 10 mødrene/søyene.

I tillegg blei det tatt samleprøve for å undersøkje for leveriktegg i avføring i løpet av oktober. Denne blei tatt av 10 tilfeldige dyr som var født i 2020, då ein rekna med at fleire av lamma som blei tatt prøvar av tidlegare allereie var blitt slakta. Produsentane kunne ta prøvane sjølv om det passa betre enn at veterinærstudent kom for å gjera det.

I nokre besetningar var ikkje alle lamma av ulike grunnar til stade ved kvar prøvetaking.

Desse mangla enten ved samling av dyra eller var blitt funne daude på beitet tidlegare.

Blodprøvane blei tatt frå *Vena jugularis* med vacutainer-systemet. Det blei brukt vakuumrøyr med raud kork slik at ein fekk serum etter centrifugering. Ved første prøvetaking var nokre av lamma små, noko som gjorde det vanskeleg å få nok blod frå desse.

Avføringsprøvar blei tatt frå endetarmen og samla opp i små lynlåsposar for å få ut mest mogleg luft. Enkelte gonger kunne det vere vanskeleg å få nok avføring frå lamma. Det kunne vere fordi dyra var blitt stressa tidlegare eller hadde stått litt for lenge samla før prøvetaking skjedde. Dei gongene det ikkje var avføring å få tak i tok ein nokre gonger prøvar av andre lam før ein gjorde eit nytt forsøk på å få tak i avføring.

Prøvemateriale blei haldt kjøleg fram til det blei sendt til NMBU Høyland for oppbevaring og analyse.

Analyse av avføringsprøvar

Avføringsprøvane blei etter kvar prøvetaking sendt med ekspress over natt eller køyrd til Høyland for analysering der. Der blei dei analysert av dei tilsette ved NMBU Høyland med modifisert McMaster-metode slik at bøndene fekk tilbakemelding på kva som blei funne av rundormar, koksidiar og bendelorm i avføringsprøvane gjennom prøvetakingsperioda.

Resultata av den eggteljinga er ikkje ein del av denne forskinga, men blei gjort som ein takk til produsentane.

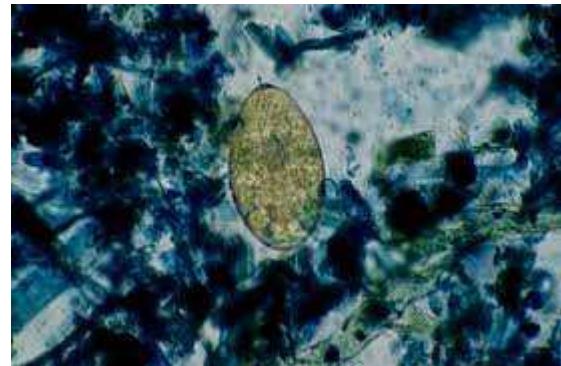
Avføringsprøvane blei innan ei veke etter dei blei tatt ut analysert for *F. hepatica* i august ved bruk av sedimentasjonmetoden som er i bruk ved NMBU Høyland. Det blei laga samleprøve for kvar besetning med det som var igjen etter ein hadde tatt ut 3g til vanleg eggteljing med modifisert McMaster-metode. Det varierte kor mykje avføring ein hadde med i samleprøven frå kvart lam.

Sjølve analysen blei gjort ved at ein hadde litt vatn i samleprøven og blanda avføringa med stavmiksar. Ein tilsette så zalovatn for å bryte overflatespenninga. Det blei brukt 1-2mL zalo per liter vatn. Løysinga blei blanda godt før den blei silt gjennom ei vanleg, grov sil. Innhaldet blei blanda ein gong til før ein silte det over i 250 mL spissglas gjennom ei finare sil med maskevidde på 250 my = 60mesh. Blandingane fekk stå på benken i minst 3 minutt slik at eggja sank til botnen. Ein brukte sug til å fjerne væska på toppen, alt utanom dei nedste 3cm av væske i spissglaset.

Det blei så fylt på med ca 200 mL zalovatn før blandinga fekk stå i nye 3 minutt og fordele seg. Større fecespartiklar flyt då opp og egg hamnar på botnen av glaset. Sug blei brukt til å fjerne væske til det var 3 cm igjen. Dette blei gjentatt til den overflødige væska var heilt klar.

Etter siste oppsuging blei botnfallet pipettert over i ei petriskål. Det blei tilsett nokre dropar 1% metylenblåttløysing. Mikroskopet var innstilt på 6,3 objektiv x 10. Metylenblått vil gjere ikteegg gule, medan plantedelar og andre egg er blå.

Resultat for undersøkinga blei angitt som “påvist ikteegg” eller “ikkje påvist ikteegg”. Då det ikkje blei målt opp nøyaktig mengde avføring til samleprøven får ein ikkje eit resultat med egg per gram feces. Det var nok å påvise eit intakt iktegg for at prøven skal bli klassifisert som “påvist ikteegg”.



Figur 5 Eit iktegg sett gjennom mikroskop (Ballweber, 2014)

Analyse av blodprøvar

Blodprøvane blei centrifugert før serum blei pipettert over i 2 prøveglas. Det eine prøveglaset meint som reserveprøve om det skulle bli behov for det. Blodprøvane blei så fryst ned på -20°C og oppbevart fram til august for ein samla analyse av alle serumprøvane.

Til testinga blei det brukt ein kommersiell ELISA-test frå IDEXX for å påvise infeksjon. Det er ein av 4 kommersielle ELISA-testar for analyse av *F. hepatica* på marknaden. Desse er IDEXX (USA), Ildana (Irland), Bio-X (Belgia) og Svanovir (Sverige). IDEXX, Ildana og Bio-X sine ELISA-testar har både sensitivitet og spesifisitet på 100% fire veker etter dyra blir infisert (Munita et al., 2019a).



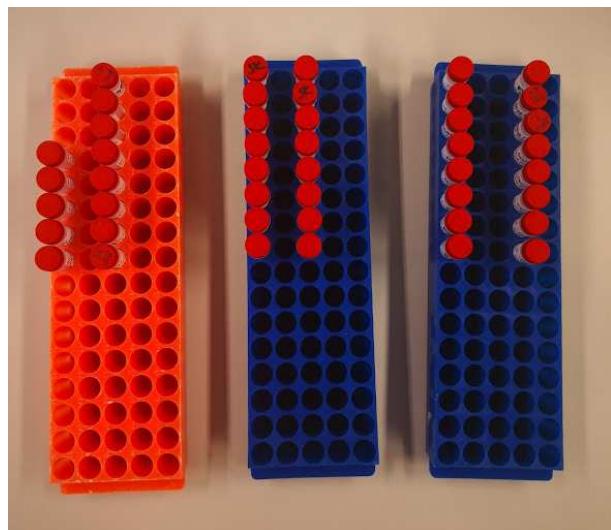
Figur 6 Oppbevaring av serumprøvar på fryselager. Her i pappesker som inneheld prøveglas med serum

IDEXX sin ELISA-test blei valt til denne oppgåva då det var mogleg å få tak i. Settet er tilsvarande det settet frå Pourquier som blei brukt til fordjupingsoppgåva i 2011 (Munita et al., 2019a; Sikveland & Søyland, 2011) og laben på NMBU Høyland er difor godt kjent med framgangsmåten. Det er tidlegare vist at Pourquier sin test kan oppdage seropositive dyr allereie 17 dagar etter dei er blitt infisert (Kuerpick et al., 2013).

IDEXX sitt *Fasciola hepatica* Antibody Test Kit kan bli brukt for å teste for antistoff i serum frå sau og ku, samt mjølk frå kyr. Antigenet «f2» er blitt ekstrahert frå parasitten og brukt i settet. Antigenet «f2» er i følgje IDEXX veldig immunogent og spesifikt for akkurat *Fasciola hepatica* (IDEXX). IDEXX sin test kan bli brukt til å vurdere effekten av ei behandling, då ein kan sjå varierande grad av reduksjon i antistoffnivå 90 dagar etter behandling(Munita et al., 2019a).

ELISA-settet har 96 brønnar satt opp i par, som gjev 48 par med brønnar. Eit par brønnar består av ein oddetalsbrønn utan antigen (eigenblind) og ein partalsbrønn med f2-antigen. På kvart brett er paret med brønnane A1 og A2 til negativ kontroll. Dei to para med brønnane B1, B2, C1 og C2 er til 2 positive kontollar. For kvart brett kan ein då teste 45 serumprøvar i dei resterande para med brønnar.

Det blei brukt manuell pipettering med Eppendorf-pipetter til det meste av pipetteringa. Der det blei brukt maskiner står det oppført vidare i oppgåva. Alle setta/bretta som blei brukt hadde REF P05120-5 og LOT 20028



Figur 7 Organisering av serumprøveglas før ELISA-testing. Serumglasa står i den rekkefølge dei skal bli pipettert i oppi ELISA-brønnane

Kvar av brønnane blei tilsett 190 µL Dilution Buffer N.2 (Thermofisher Multidrop Combi). Deretter blei det manuelt tilsett 10 µL negativ kontroll (LOT 3309) i to brønnar og 10µL positiv kontroll (LOT 3300) i 4 brønnar. 10 µL av serum blei tilsett resterande 90 brønnar etter plan som var sett opp på førehand. Fortynninga blei så homogenisert i 5 sekund (Thermofisher Multidrop Combi). Bretta blei inkubert i 1 time ved 37°C.

Om det då er antistoff mot «f2» i prøven vil dette feste til antigenet i dei brønnane som har antigen i seg med antigen-antistoff immunkompleks-bindingar (IDEXX).

Væska blei fjerna frå brønnane med Biotek Elx50. Elx50 var på førehand innstilt på eit vaskeprogram som vaska brønnane med 300 µL vaskeløysing 3 gonger for å få vekk materiale som ikkje har festa til antigena. Vaskeløysinga blei laga til med Wash Concentrate som kom med ELISA-settet og fortynna 1:20 med ionisert vatn på laben. For å få ut siste rest av vaskeløysing blei bretta dunka mot absorberande materiale på arbeidsbenken.

Kvar av brønnane blei tilsett 100µL konjugat som bind til immunkompleks-bindingane der dei er blitt



Figur 8 ELISA-brettet frå IDEXX. Her er det tilsett 190 mL Dilution Buffer N.2.



Figur 9 Stopreagens blir tilsett brønnane slik at dei blå blir gule. Omslag frå blankt til blått betyr binding mellom antistoff og antigen

danna. Konsentrert konjugat blei rett før fortynna 1:100 med fortynningsbuffer N.1 som kom med settet. Bretta blei så inkubert i 30 minutt ved 37°C.

Innhaldet i brønnane blei fjerna og brønnane på ny skylt 3 gonger med 300 µL vaskeløysing (Elx50) for å få vekk konjugat som ikkje hadde bunde til immunkompleks. Restrererande væske blei fjerna frå brønnane ved å dunke brettet mot absorberande materiale på arbeidsbenken. 100 µL TMB-substrat N.13 blei tilsett kvar av brønnane før brettet blei inkubert mørkt i ei skuffe i romtemperatur i 20 minutt. Om enzymet frå konjugatet er til stade vil substratet i TMB bli oksidert og ein får fargeomslag til blått.

Etter inkubering blei det tilsett 100 µL Stop Solution N.3 til kvar brønn og blåfargen slo om til gult. Rett etterpå blei maskinen Thermoscientific Multiscan Go innstilt på 450 nm og brukt til å måle optiske verdiar på prøvane.

Tolking av prøveresultata

Resultata blei kalkulert ved å trekke verdiane frå brønnane utan antistoff frå verdiane til brønnane med antistoff. Desse blei så dividert på gjennomsnittet til dei optiske verdiane til dei positive kontrollane og multiplisert med 100. Ein får då ein verdi på S/P%. Cut-off-verdiane frå produsenten blei brukt for å gradere antistoffnivåa (tabell 1). Prøvar med S/P% > 30 blei sett på som positive.

Tabell 1. Cut off-verdiar for antistofffiter

Negativ	Svak positiv	Positiv		Sterk positiv
$S/P\% \leq 30$	$30 < S/P\% \leq 80$	$80 < S/P\% < 150$		$S/P\% \geq 150$

For å teste reproducirbarheita til ELISA-testen blei 10 tilfeldige prøvar som hadde $20 \geq S/P\% \leq 40$ køyrt på ny i trippeltar. Desse trippeltane blei köyrd av ein student på eit brett. Resultat kjem fram i tabell 3 seinare i oppgåva.



Figur 10 ELISA-brettet blir plassert i Thermoscientific Multiscan Go. Her kan ein sjå at mange av brønnane er gule og viser binding mellom antistoff og antigen

Statistiske metodar

Resultata frå ELISA testen i form av S/P% verdiar er sett inn i Microsoft Excel. Funksjonar i programmet er vidare brukt til å sette opp tabellar og til å rekne ut gjennomsnitt og samanlikne verdiar. Det er blitt samanlikna gjennomsnittleg S/P%-verdi og tal dyr klassifisert som positive for dei ulike prøvetakingsomgangane og for ulike grupper dyr. Distribusjonen i S/P% verdiane viser ein positivt skeiv fordeling.

For å estimere kor lenge lam har nivå av antistoff som gjev positiv ELISA-prøve er det brukt regresjonsverktøyet på Casio-kalkulator (Casio Graph 85 SD) for å finne ein funksjon som passar til datasettet vårt med alder og S/P%-verdi (matematikk.org). I hovudmeny blei val 2 (STAT) tatt. Resultata frå prøvetakinga blei satt inn i tabell med alder i veker i liste 1 og S/P%-verdi i liste 2. Utrekning vidare på kalkulatoren var F2 (CALC), så F3 (REG), og til slutt F3 (X^2) og F4 (X^3) for å finne regresjonsfunksjon som passa best til dei tala me hadde etter ELISA-testen. Funksjonen blei sett inn i Geogebra med alder på x-akse og S/P%-verdi på y-akse. For å estimere alderen der lammet går frå å ha positiv til negativ prøve fann me kryssingspunkt mellom funksjonen for S/P%-verdi og linja $y=30$, då cut-off-verdien for S/P% er 30.

Resultat

Eggteljing

Det blei ikkje påvist egg frå *F. hepatica* i nokon av dei ti samleprøvane som blei undersøkt for leveriktegg i august. Frå to av besetningane blei det ikkje laga samleprøve for ikteeggpåvising grunna for lite prøvemateriale.

Av samleprøvane frå 8 av besetningane som blei undersøkt i veke 42, blei det påvist ikteegg hjå 2 av besetningane, besetning A og D. Prøvane frå resten av besetningane blei analysert i veke 43. Av desse 3 besetningar var det berre ei prøve som var positiv, frå besetning H. Besetningane som fekk påvist ikteegg i avføringsprøvane i oktober hadde alle positive serumprøvar i august. Men det var òg besetningar med positive serumprøvar i august som ikke fekk påvist ikteegg i avføringsprøvane.

Serologi

Resultat for studiepopulasjonen samla

Ved første del vil me i resultata gå gjennom studiepopulasjonen som ein heilskap. Det er her viktig å hugse på at individua er valt ut på bakgrunn om mistanke om leverikte etter diverse kriteria som nemnd tidlegare.

Besetning L

Ved analysering av serumprøvane blei prøvar frå mai og august analysert først. Alle prøvar frå besetning L var negative med låge S/P% verdiar både i mai og august, for både søyer og lam. Difor blei ikkje dei resterande 20 prøvane frå juni og juli frå denne besetninga analysert.

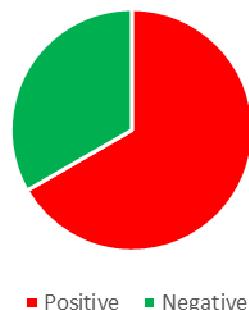
Prøvar frå mai:

Søyer:

I mai vart det teke ut blodprøvar frå 10 søyer frå kvar besetning, totalt 120 prøvar.

Serumanalyse for antistoff mot *F. hepatica* blei gjort for alle prøvane. Av 120 prøvar vart 80 av desse klassifisert som positive og 40 klassifisert som negative. Dette gav oss ein prevalens i utvalet av søyer på 67% for positivt resultat foreinleg med infeksjon for *F. hepatica*. Gjennomsnittleg S/P% verdi for alle dei 120øyene var 80,1, med eit standardavvik på 64. Mens gjennomsnittleg S/P% forøyene klassifisert som positive var 110,3, med standardavvik på 48,4.

Fordeling mellom positive og negative søyer i mai



Figur 11. Fordeling av øyer klassifisert som positive og negative for *F. hepatica* etter serumanalyse

Lam:

I mai vart det forsøkt å teke prøvar frå eit utval på 240 lam, av desse var det 220 lam som ein fekk tilstrekkeleg mengde blod frå for serumanalyse av antistoff. Lamma var fordelt på 12 besetningar, jamfør planen om å ta prøvar frå 20 lam frå kvar besetning.

Av 220 analyserte prøvar var 84 klassifisert som positive. Det gav oss ein prevalens på 38% for lam positive for antistoff mot *F. hepatica* i mai. Gjennomsnittleg S/P% verdi for dei 220 lamma var 50,9, med standardavvik på 65,0. Mens gjennomsnittleg S/P% for lamma klassifisert som positive var 101,7, med standardavvik på 55,1.

Ser ein berre på lamma som blei med vidare i prøvetakinga er 53 av 114 analyserte prøvar (120 forsøkt prøvetatt) positive. Dette gjev ein prevalens på 46,5 som er høgare enn prevalensen for heile studieutvalet av lam i mai. Vidare i oppgåva blir prevalensen for heile studieutvalet av lam i mai brukt.

Prøvar frå juni

Lam:

I juni vart det teke prøvar frå 120 lam, fordelt på 12 besetningar. Prøvane frå besetning L (10 stk.) blei ikkje analysert, og ei prøve frå ein anna besetning inneheldt for lite blod for analyse. Det blei analysert 109 prøvar for antistoff. Av desse var 34 prøvar klassifisert som positive og 75 prøvar klassifisert som negative. Dette gav ein prevalens på 31% for lam positive for antistoff i juni. Gjennomsnittleg S/P% verdi var samla 28,2, med standardavvik på 36,4. Mens gjennomsnittleg S/P% verdi for dei klassifisert som positive var 74,2, med standardavvik på 32,8.

Prøvar frå juli

Lam:

I juli vart det teke prøvar frå 120 lam, fordelt på 12 besetningar. Prøvane frå besetning L (10 stk.) blei ikkje analysert. Det blei analysert 110 prøvar for antistoff. Av desse var 11 prøvar klassifisert som positive og 99 prøvar klassifisert som negative. Dette gav ein prevalens på 10% for lam positive for antistoff i juli. Gjennomsnittleg S/P% verdi var samla 10,9, med standardavvik på 20,5. Mens gjennomsnittleg S/P% verdi for dei klassifisert som positive var 60,6, med standardavvik på 30,3.

Prøvar frå august

Lam:

I august vart det teke prøvar frå 120 lam, fordelt på 12 besetningar. 120 prøvar blei analysert, av desse var 34 prøvar klassifisert som positive og 86 prøvar klassifisert som negative. Dette gav ein prevalens på 28% for lam positive for antistoff i august. Gjennomsnittleg S/P% verdi var samla 27,5, med standardavvik på 48,2. Mens gjennomsnittleg S/P% verdi for dei klassifisert som positive var 91,7, med standardavvik på 42,9.

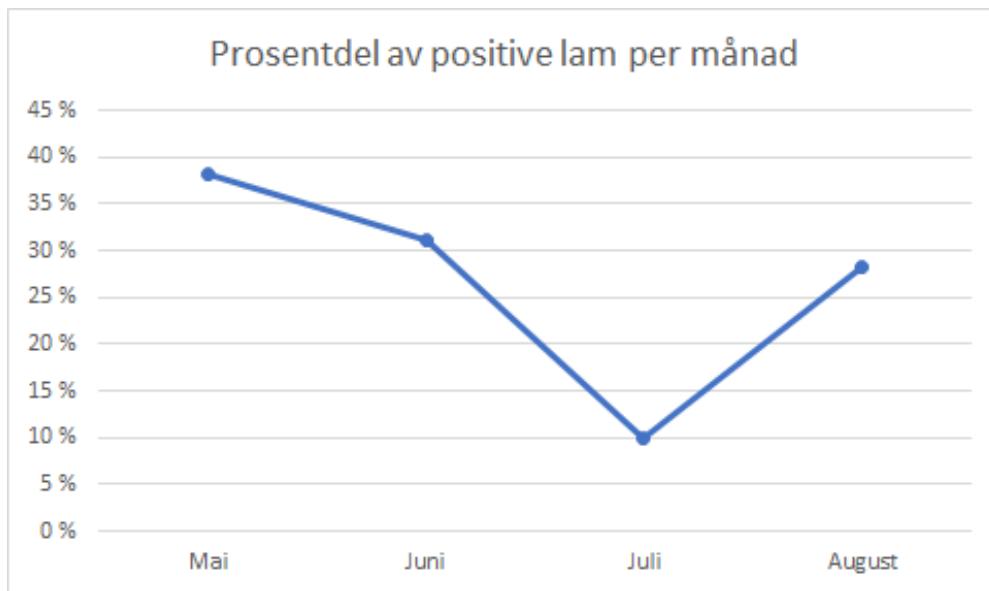
Utvikling i studieutvalet som heilskap

Ved å setje opp alle resultat som er presentert tidlegare i ein tabell, får ein ei betre oversikt over utvikling i antistoffnivå for heile studieutvalet, som kjem fram i tabell 2. Her blir prosentdel av lam som får påvist antistoff over cut off-verdi og prosentdel som får påvist under cut off-verdi ved serumanalyse presentert for kvar månad. Det er også blitt rekna ut høgaste observerte S/P%-verdi, gjennomsnittleg S/P%-verdi for positive prøvar og standardavvik til dette gjennomsnittet for kvar månad.

Figur 12 visar korleis prosentdel lam som får påvist antistoff endrar seg gjennom prøvetakingsperioden.

Tabell 2 Oversikt over resultat for studieutvalet av lam gjennom heile prøvetakingsperioden

	Mai	Juni	Juli	August
Lam med antistoff over cut off-verdi	38%	31%	10%	28%
Lam med antistoff under cut off-verdi	62%	69%	90%	72%
Høgaste observerte S/P% verdi	272,6	152,7	113,9	158,4
Gjennomsnittleg S/P% verdi for lam klassifisert som positiv	102	74,2	60,6	91,7
Standardavvik	55,1	32,8	30,3	42,9



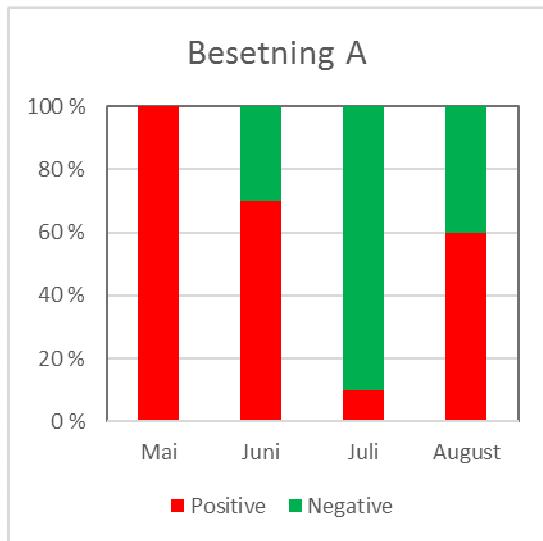
Figur 12 Utvikling av prosentdel analyserte prøvar frå lam klassifisert som positiv etter serumanalyse frå mai til august

Endring av lamma sin smittestatus gjennom beitesesongen

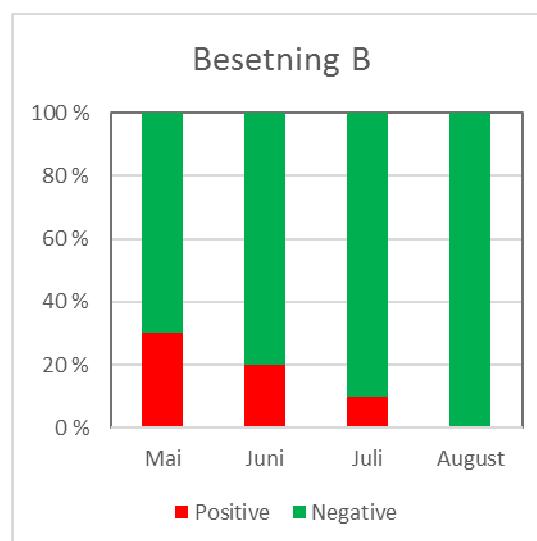
Vedlegg 3 viser ved kva månad lam blir positive, etter dei har vore negative månaden før.

Ved prøvetaking i juni var det ingen lam som var positive om prøven deira var negativ i mai.

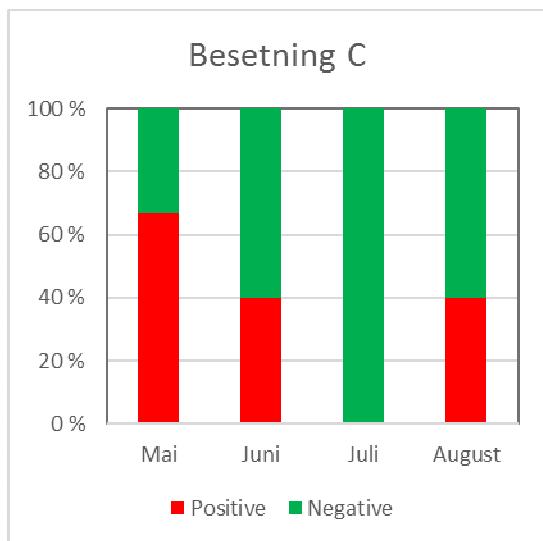
I juli var det eit lam som var positivt etter å vore negativt i juni. Dette lammet var også negativt i mai, jamfør fargekoden på stolpen i diagrammet. I august var det 28 lam som vart klassifisert som positive etter å ha vore negative i juni. Av desse hadde 10 vore positive i mai og 18 vore negative.



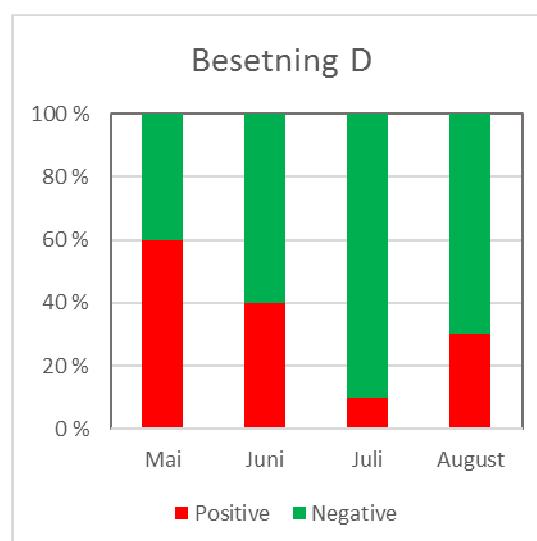
Figur 13 Fordeling av positive og negative lam for kvar månad i besetning A



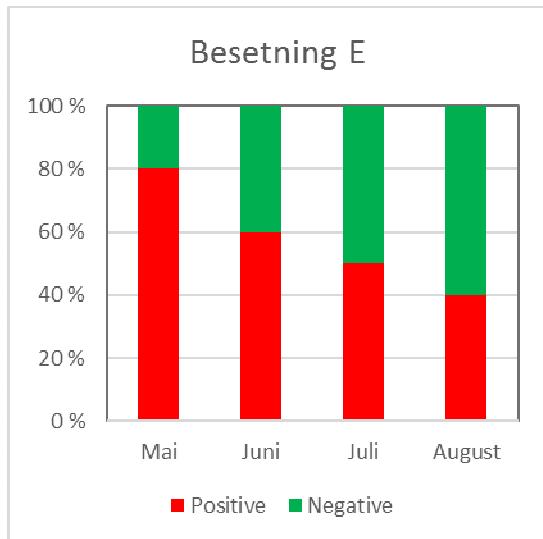
Figur 15 Fordeling av positive og negative lam for kvar månad i besetning B



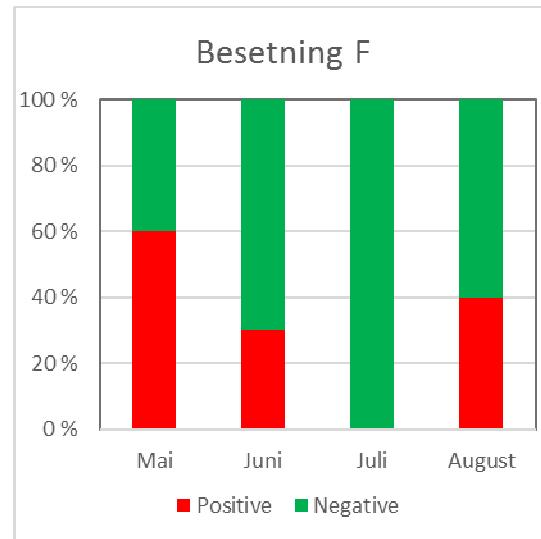
Figur 14 Fordeling av positive og negative lam for kvar månad i besetning C



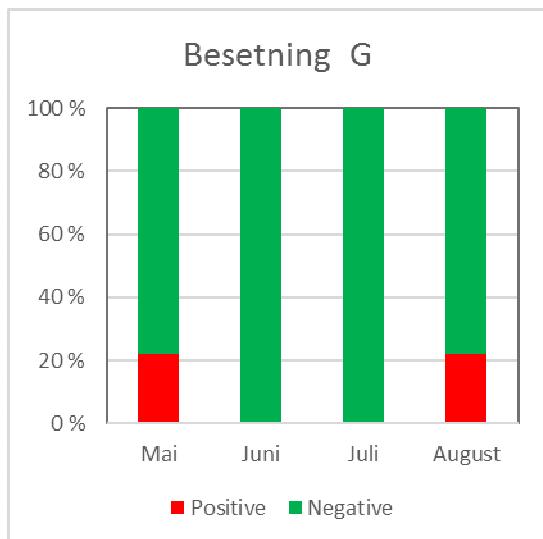
Figur 16 Fordeling av positive og negative lam for kvar månad i besetning D



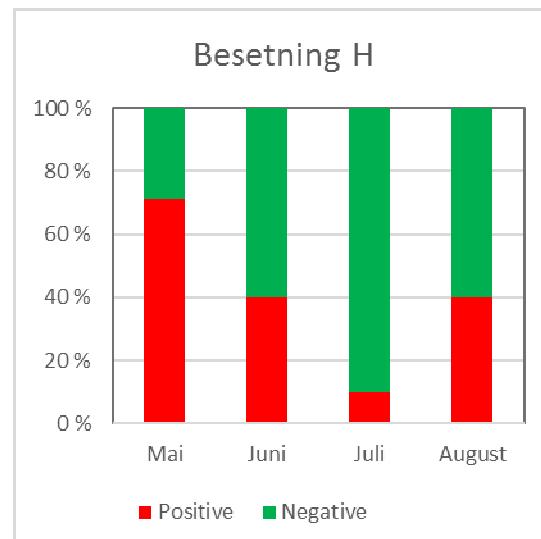
Figur 17 Fordeling av positive og negative lam for kvar månad i besetning E



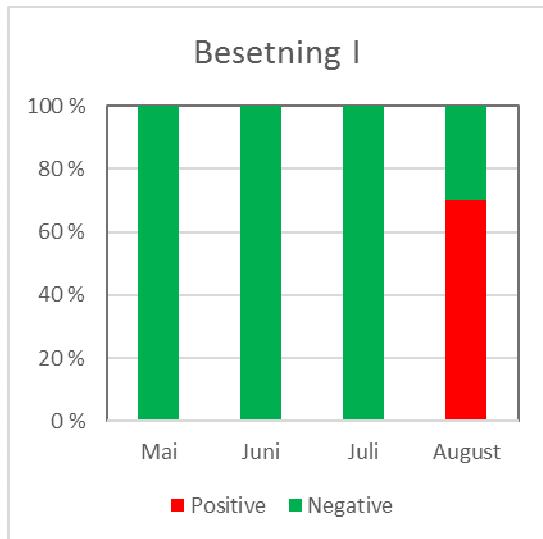
Figur 19 Fordeling av positive og negative lam for kvar månad i besetning F



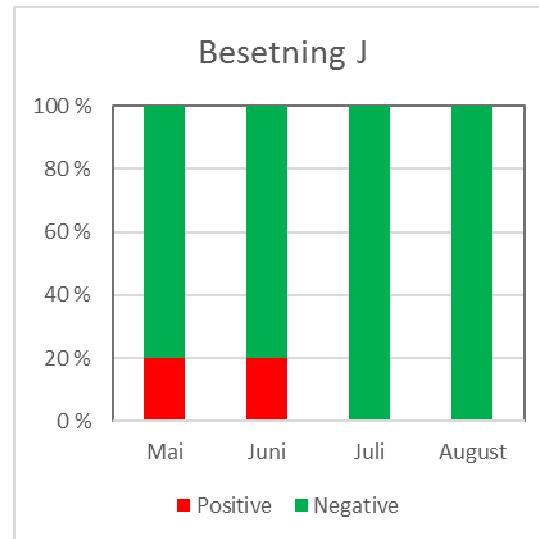
Figur 18 Fordeling av positive og negative lam for kvar månad i besetning G



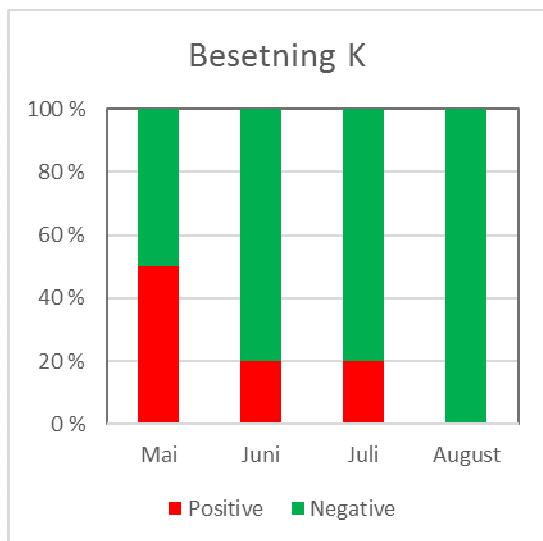
Figur 20 Fordeling av positive og negative lam for kvar månad i besetning H



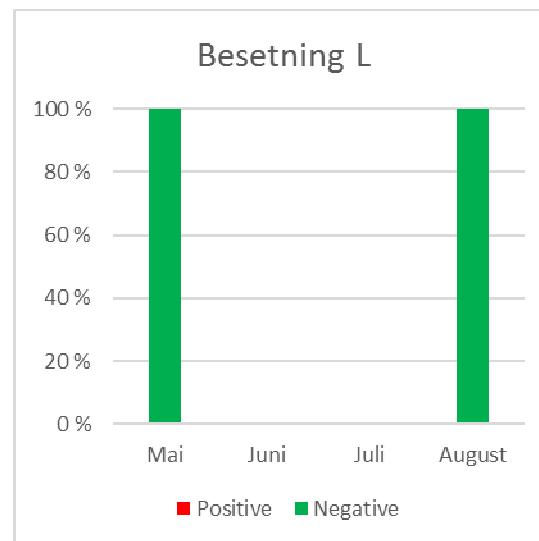
Figur 21 . Fordeling av positive og negative lam for kvar månad i besetning I



Figur 23 Fordeling av positive og negative lam for kvar måned i besetning J



Figur 22 . Fordeling av positive og negative lam for kvar måned i besetning K



Figur 24 Fordeling av positive og negative lam for kvar måned i besetning L

Tripletta

Resultata frå dei 10 prøvane som er køyrd som tripletta kjem fram i tabell 3. Desse ekstra resultata for serumanalysane er ikkje tatt med i utrekning av gjennomsnitt. Det er S/P%-verdi for første analyse som er blitt ståande som gjeldande resultata. Gjennomsnitt og standardavvik er rekna ut for kvar serumprøve sine tripletta.

Tabell 3. Tripletterverdiar for 10 tilfeldige serumprøvar. Raud viser positiv prøve og grøn viser negativ prøver.

Resultat tripletta										
Prøve ID/lam	4A1-2	4A3-2	4F5-2	4F1-2	4E2-1	4E2-2	4E5-2	4G5-1	4I3-2	4C5-2
S/P% ved første analyse	22,6	22	30,2	19,6	33,5	34,8	33,3	36,6	35,7	31,8
Tripletterverdi 1 (S/P%)	31,1	28	33	22,9	36,7	37	50,2	31,9	22	38,3
Tripletterverdi 2 (S/P%)	19,8	29,2	33,8	19,1	39,3	19,1	48,5	23,1	20,9	38,3
Tripletterverdi 3 (S/P%)	26,3	26,8	39,9	15	31,6	33	44,3	35,7	35	37,3
Gjennomsnitt tripletterverdiarar	25,7	28,0	35,6	19,0	35,9	29,7	47,7	30,2	26,0	38,0
Standardavvik for tripletterverdi	4,6	1	3,1	3,2	3,2	7,7	2,5	5,3	6,4	0,5
CV (%)	18	3,5	8,7	17	8,9	25,8	5,2	17,5	24,7	1,2

Estimering av varighet på maternale antistoff

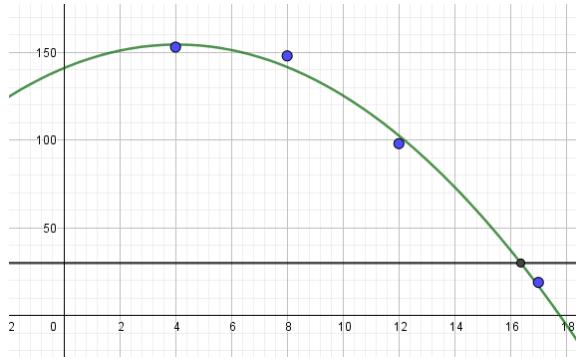
For å estimere kor lenge lamma vil ha antistoff som gjev positivt prøvesvar, har me ved hjelp av regresjon funne kva funksjon som best visar utviklinga i antistoffnivåa hjå utvalde lam. Det er valt ut to tvillingsett der alle lamma har høge nivå lenge. Alle fire lamma er født 12. april 2020.

Tabell 4. Verdiar i datasett som blei sett inn i høvesvis liste 1 for alder ved prøvetaking og liste 2 for S/P%-verdi på Casio Graph 85SD for å estimere varighet av maternale antistoff

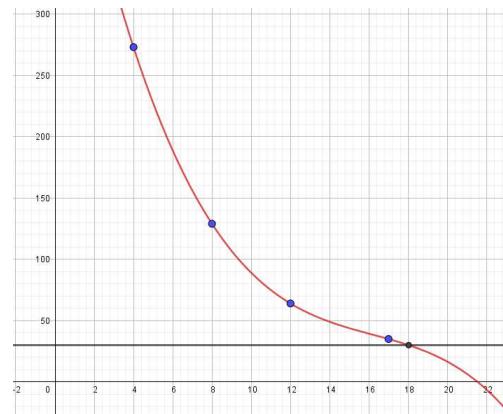
Verdi liste 1	4 veker	8 veker	12 veker	17 veker
Verdi liste 2 E2-1	255	131	72	34
Verdi liste 2 E2-2	273	129	64	35
Verdi liste 2 K2-1	172	105	41	7
Verdi liste 2 K2-2	153	148	98	19

For lam K2-1 og K2-2 var det andregradsfunksjon ($y=ax^2+bx+c$) som passa best til resultata frå ELISA-testen. Dei respektive funksjonane for estimert S/P%-verdi var $y = 0,62x^2 - 25,9x + 267,51$ for K2-1 og $y = -0,82x^2 + 6,64x + 141$ for K2-2. Dette gav eit kryssingspunkt med $y=30$ ved $x=13,55$ og $x=16,37$ for høvesvis lam K2-1 og K2-2. Dette betyr at lam K2-1 vil ha positiv prøve til det er vel 13 veker gammalt og lam K2-2 til det er 16 veker gammalt.

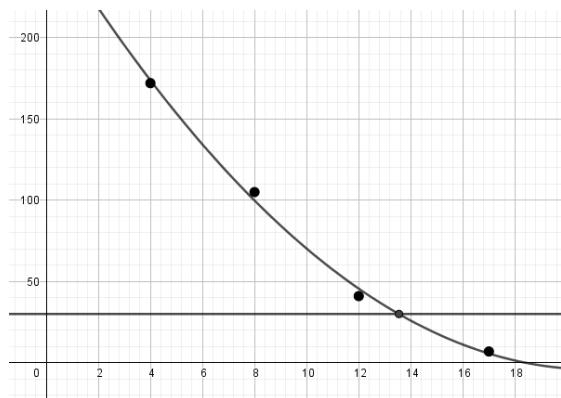
For lam E2-1 og E2-2 var det tredjegradsfunksjon ($y=ax^3+bx^2+cx+d$) som passa best til resultata. For E2-1 blei estimert funksjon $y = -0,1x^3 + 4,31x^2 - 72,12x + 480,53$. For E2-2 blei estimert funksjon $y = -0,1x^3 + 4,88x^2 - 83,33x + 534,63$. Dette gav eit kryssingspunkt med $y=30$ ved $x=17,49$ for lam E2-1 og $x=18,03$ for E2-2, som svarar til positiv ELISA-test ved 17 vekers alder for E2-1 og 18 vekers alder for E2-2.



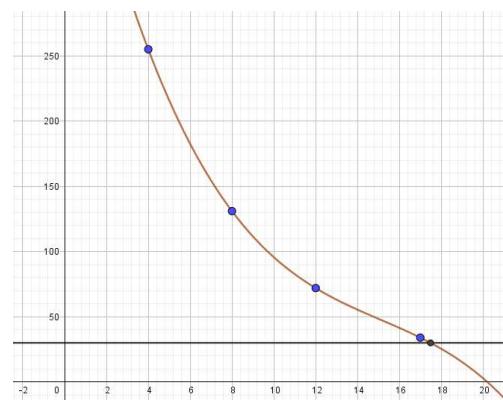
Figur 25 Estimert funksjon ($y = -0,82x^2 + 6,64x + 141$) for S/P%-verdi til K2-2. S/P%-verdi på y-akse, alder på x-akse.



Figur 27 Estimert funksjon ($y = -0,1x^3 + 4,88x^2 - 83,33x + 534,63$) for S/P%-verdi for E2-2. S/P%-verdi på y-akse, alder på x-akse.



Figur 26 Estimert funksjon ($y = 0,62x^2 - 25,9x + 267,51$) for S/P%-verdi til K2-1. S/P%-verdi på y-akse, alder på x-akse.



Figur 28 Estimert funksjon ($y = -0,1x^3 + 4,31x^2 - 72,12x + 480,53$) for S/P%-verdi til E2-1. S/P%-verdi på y-akse, alder på x-akse.

Diskusjon

Betydning av funn

I vanleg praksis vil det ta lang tid før ein får påvist smitte med leveriktar om ein brukar avføringsprøvar som einaste diagnostiske verktøy. Då vil heller kjennskap om beitetype, kliniske symptom og tidlegare problem med leveriktar i besetninga vera viktigare for å kunne stille diagnosen fasciolose.

Etter erfaring er ikkje USR-rapport noko sensitiv metode for å påvise smitte med leveriktar. Produsent K har til dømes ikkje fått noko merknad på leverkassasjon på det som er blitt slakta av sau og lam hausten 2020 (prod. K, pers.inform). I denne besetninga har me på blodprøvane sett at det blir overført antistoff med råmjølka til lamma, så her burde det vera forandringar på levrane til sauene. Produsent I har berre fått merknad på eitt lam som er sendt til slakt, men dette er ikkje eitt av forsøkslamma. Dei får derimot leverkassasjon på alle kyrne som går til slakt (prod. I, pers.inform). I denne besetninga har lamma blitt smitta i løpet av beitesesongen, då ein kan sjå at lamma går frå negativ i juli til positiv i august. I besetning D er det hausten 2020 slakta 79 lam og 6 søyer. Av desse er det berre tre lam som har fått merknad for store leverikten på slakteriet. Dette var lam som ikkje var med i studieutvalet. Dei tre lamma frå besetning D som var positive i august, lam D1-2, D3-2 og D4-1 med S/P% verdiar på høvesvis 152, 61 og 136, fekk ikkje merknad på slakteri (prod.D, pers.inform).

Det kan vere eit sikrare alternativ å bruke serum for å påvise antistoff for å finne ut om dyra er blitt smitta. Då vil ein kunne få svar mykje tidlegare, og bonden kan finne ut kor tidleg i beitesesongen dyra har fått i seg smitte. Produsenten kan få ein peikepinn på kor dyra blei smitta om dei har store areal å beite på og flyttar på seg i løpet av beiteperioden. Om ein brukar serumprøvar tidleg på sommaren må ein vere obs på at det kan vera maternale antistoff ein eventuelt påvisar. Det er individuelle skilnadar på kor lenge lamma har maternale antistoff

i blodet, så det kan variere mellom besetninga når ein er sikker på at prøvane er positiv grunna ny smitte på beitet. Ut i frå resultata våre er det først tredje veka i august ein kan vere sikker på at det ikkje er maternale antistoff i blodprøvane. Eit eksempel på dette er lam K2-1 og K2-2 som begge hadde positiv prøve ved 12 vekers alder. Bonden hugsa at sauken (K2) hadde mjølka godt, så desse lamma har fått i seg rikeleg med råmjølk. For desse to lamma har me estimert at dei maternale antistoffa vil gje positiv prøve heilt fram til 13 vekers alder for K2-1 (figur 18) og 16 vekers alder for K2-2 (figur 17). Det betyr at eit lam født 12. april vil kunne ha positiv prøve grunna maternale antistoff til starten på august. Eit anna eksempel er lam E2-1 og E2-2 som begge har positiv prøve i august. Desse ser ut til å vera maternale antistoff, og slik det kjem fram i figur 19 og 20, vil dei ha maternale antistoff fram til 17 og 18 vekers alder, noko som svarar til midten av august for eit lam som er født 12. april. For å kunne bruke serum som eit diagnostisk hjelpemiddel må det vere mogleg å sende serum til eit laboratorium som kan analysera prøvane. Det er fordi ELISA-testen som blei brukt i dette prosjektet vil krevje meir utstyr enn kva ein vanleg veterinærklinikk har, då spesielt for ein veterinær som hovudsakleg held på med produksjonsdyr i kvardagen.

Resultata etter desse prøvetakingane vil ein truleg berre kunne nytte i områda rundt Sunnhordaland og Ryfylke, eventuelt tilsvarande område med liknande klima. Det vil likevel vera skilnadar innafor desse områda òg. Eit eksempel er besetning I og J som begge har smitte i besetningane. Desse ligg omtrent 7 km frå kvarandre i luftlinje, men det er likevel stor skilnad på når i beitesesongen lamma har fått i seg smitte. Besetning I får ein stor del lam positive i august, medan besetning J har ingen positive lam i august. Ingen av desse to besetninga hadde positive lam i juli.

Produsentar og veterinærar i områda rundt besetningane i prosjektet med liknande klimatiske forhold vil kunne bruke resultata til å sjå når det er størst sjanse for at dyra blir smitta gjennom beitesesongen.

Dei lamma som har høge nivå av antistoff mot leveriktar tidleg i prøvetakingsperioden er truleg eit resultat av eit godt opptak av råmjølk. Sauen har produsert nok mjølk med god kvalitet til alle lamma. Lamma har fått i seg nok råmjølk tidleg nok til at antistoffa er blitt tatt effektivt opp frå tarm. Dette vil gjere at dei får i seg mykje energi dei første timane etter fødsel og gjev dei antistoff mot andre agens som mora er eksponert for. Det er omdiskutert kor god beskyttelse antistoff mot leveriktar gjev. Eit studie visar til at antistoff mot leveriktar kan gje ein viss beskyttelse, men dette kjem an på kva rase verten er, og samspelet mellom leveriktar og vert (Toet et al., 2014).

Tolking og vurdering av resultata

Vurdering av resultat frå avføringsprøvane

Avføringsprøvane er analysert som samleprøvar frå kvar besetning for å kunne påvise eventuelle egg frå *F. hepatica*. Resultata viser ingen forekomst av ikteegg før i oktober, veke 41. Då vart det påvist egg frå iktar i avføringsprøvar frå lam i to av besetningane (besetning A og D). Ein besetning (besetning H) fekk påvist ikteegg frå avføringsprøve frå lam teke veke 42. Ved desse avføringsprøvane er det nødvendigvis ikkje same lam som frå dei tidlegare prøvetakingane det er teke prøvar frå. Grunnen til dette er mange lam frå besetningane allereie er slakta. Samleprøven ble difor tatt frå eit tilfeldig utval av 10 lam i kvar besetning. Funn av ikteegg hos lam i oktober stadfestar infeksjon med eit sannsynleg infeksjonstidspunkt for minst 6-7 veker sidan (Gjerde, 2011), då det er tida det tar for metacercariene å utvikle seg til vaksen ikte som igjen kan skilje ut egg. I ein studie frå Frankrike observerte ein ikteegg i avføring hos sau først i perioden 10-12 veker etter infeksjon (Chauvin et al., 1995). For dyra i desse besetningane betyr det at infeksjonstidspunktet var seinast veke 35 om ein går ut ifrå at det tek 6 veker før iktene kan skilje ut egg. Om ein følgjer observasjonane i Frankrike (1995) kan ein argumentere for at infeksjonstidspunktet var seinast veke 31 (siste veka i juli).

Det at avføringsprøvane er negative for ikteegg er ikkje einstydande for at det ikkje er vaksne ikte i dyra. Dette fordi eggutskiljing hos ikte er intermitterande og sensitiviteten til sedimentasjonstesten er låg (Charlier et al., 2008). For å kunne bestemme eit meir nøyaktig infeksjonstidspunkt av ikte utifrå avføringsprøvar hadde det vore ein fordel med hyppigare prøvetaking for dette i perioden frå august og utover hausten.

Maternale antistoff

Serologiresultata frå søyer i mai viste ein prevalens hos søyene per besetning som varierer frå 0% til 100%. Det var ein besetning med ingen positive søyer i mai, her var også alle lamma negative i august (besetning L). Om ein ser på alle prøvetatte søyer i mai samla, var 67% av søyene positive. Trekk ein ifrå besetning L, utan positive dyr i mai, får ein at prevalens hos søyene på 73%. S/P% verdiane for dei positive søyene var i gjennomsnitt 110,3. Med ein variasjon i S/P% mellom 30,6 og 206,3. Det er beskrive at ein kan gradere positive S/P% verdiar som nemnd i metodebeskrivinga (tabell 1), og at dette igjen kan spegle mengda metcercariar ved infeksjon (Chauvin et al., 1995; IDEXX). Sidan infeksjonstidspunkt for søyene her vil være ukjent, har me i denne oppgåva ikkje fokusert vidare på å estimere dette. Det kan tenkast at søyene har teke opp smitte over fleire sesongar og at dette påverkar mengda antistoff (Gjerde, 2011).

Ser ein på serologiresultata frå lamma i mai, var 38% av alle prøvetatte lam positive for antistoff mot *F. hepatica*. Gjennomsnittleg S/P% verdi for lamma var 50,9, og varierte mellom 34,9 og 272,6 for dei positive. Ser ein berre på serologiresultat frå lam etter søyer som var positive i mai, er 59% av desse klassifisert som positive.

Grunna sin unge alder ved prøvetakinga i mai er positivt resultat hos lamma ved denne prøvetakinga å rekne som eit resultat av maternal overføring av antistoff via kolostrum (Novobilsky et al., 2012) (Novobilský et al., 2014). Ein skulle gjerne sett at alle lam etter positive søyer var positive for antistoff mot *F. hepatica* grunna maternal overføring av

antistoff, men det er fleire faktorar som kan påverke mengde antistoff som blir overført med kolostrum. Dette kan blant anna vera mengde antistoff hos søya, noko som igjen kan påverkast av fleire faktorar. Til dømes tidspunkt for infeksjon og infeksjonsdose (Kuerpick et al., 2013). Eventuelle tidlegare infeksjonar og behandling med aktuelle parasittmidlar er også å rekne som aktuelle faktorar (Munita et al., 2019a; Williams et al., 2014). I vår studie har fokuset primært vore positiv/negativ klassifisering utifrå S/P% verdi for antistoff, noko som framleis kan vera høgt etter behandling. Det hadde vore interessant med avføringsprøvar frå soyene i mai for å kunna påvise ikteegg og eventuell pågående infeksjon, og om det vidare påverka resultata både på serologi hos soyene og lam. Råmjølkskvaliteten hjå soyene og opptaket hos lamma vil også vere ulikt i utvalet. Dette er ikkje målt, og ein kan heller ikkje utelukka at det er blitt fordelt råmjølk mellom lam og soyene frå ulike kull, og at lam av same kull har hatt ulikt råmjøksopptak, som kjem fram i tabellane i vedlegg 1. Alder hjå lamma ved prøvetaking kan også spele inn i forhold til naturleg senking av antistoff nivå grunna halveringstid. Majoriteten av lamma var eldre enn tre veker ved første prøvetaking i mai, som vist i vedlegg 1. Berre 2 tvillingpar i heile forsøksutvalet var yngre enn 8 dagar, 15 av tvillingpara var mellom 8 og 21 dagar gamle, og dei resterande 103 tvillingpara var over 21 dagar gamle ved første prøvetaking.

Ved prøvetakinga i juni ser ein at det framleis er ein stor del positive lam. 31% av lamma var positive, altså ein reduksjon frå 38% positive av lamma i mai. Om ein ser på S/P% verdiane var gjennomsnittet frå alle lam i mai 50,9, mens det i juni var 28,2. Dette [S/P% verdi] reflekterer mengde antistoff. Det var heller ingen av dei lamma som var positive i mai som viste auke i S/P%-verdi i juni.

Til prøvetakinga av lam i juli viste dei serologiske undersøkingane at tal positive lam vart mykje lågare, og det var då berre 10% av dei prøvetekne lamma som var positive. Ved prøvetakinga i august steig tal positive lam betydeleg, og det var då 28% positive lam. Då vil

lamma kunne produsere eigne antistoff om dei blir eksponert for antigen. Dette ser ein og på kurva i figur 4. Denne utviklinga stemmer med det dei fann i ei studie på kalvar, som visar at kalvane fekk ei rask auke i antistoffnivåa før dei blei redusert, og ein ikkje kunne finn antistoff hjå kalvar >12 veker (Mezo et al., 2010).

Det at talet på positive lam stig frå juli til august indikerer at lamma sjølve har teke opp metacercariar i perioden mellom desse prøvetakingane. Det er vist at antistoffnivå stig signifikant i veke 3 og 4 etter infeksjon [opptak av metacercariar] hjå sau (Chauvin et al., 1995). På kalv er det vist at dei når eit platå 4-5 veker etter infeksjon (Kuerpick et al., 2013). Sidan det tek minst to veker frå opptak av metacercariar til ein finn spesifikt antistoffsvaret for *F. hepatica* (Williams et al., 2014), vil tidlegaste tidspunkt for infeksjon om lamma er negative i juli og positive i august, derfor vera to veker føre prøvetakinga i juli. Og på same måte vil seinaste tenkte tidspunkt for smitte i eit slikt scenario vera 2 veker føre prøvetakinga i august. Ein har likevel ikkje oppdaga alle lamma som er smitta, då sensitiviteten aukar dei første vekene etter infeksjon og det er først 4 veker etter infeksjon at sensitiviteten er 100% for Pourquir-testen (Kuerpick et al., 2013), som er den originale utgåva av ELISA-testen me har brukt (Munita et al., 2019a).

Sjølv om den generelle trenden er at lamma gjekk frå å være negative ved prøvetaking i juli, til å bli positive i august, var det eit lam (D1-2) som gjekk frå å være negativ i juni til å bli positiv i juli. Noko som kan bety at lamme blei smitta ein gong mellom 2 veker før prøvetaking i juni til to veker før prøvetakinga i juli. Dette lammet hadde ytterlegare stigning i S/P % verdi i august. Dette kan indikere at lam kan bli smitta tidlegare i beitesesongen enn kva trenden viser.

Metodeavgrensing

Prøvetakinga er gjort av tre ulike personar i fire ulike kommunar, noko som gjere det vanskeleg å sikre standardisering av prøvane frå dei blir tatt til dei er analysert. Oppbevaring

fram til sending, transporttid og forholda under transport til Høyland kan variere mellom dei ulike områda og besetningane. Temperatur og oppbevaringstid før analyse og ekstrasjon av serum kan vera faktorar som påverkar resultata på ELISA-testen.

Første prøvetaking i mai tok lang tid, blant anna fordi det var mange og unge dyr. Som det kjem fram i tabellane i vedlegg 1, var det varierande alder på lamma frå 1 veke til 1,5 månad ved første prøvetaking. Dette gjorde at ein ikkje kunne bruke same fikseringsteknikk på alle lamma. Ein måtte tilpasse det til kvar besetning og rettleie produsenten i korleis halde dyra godt nok. På små lam med små blodårer kunne det vere vanskeleg å finne blodåra og få nok blod frå, spesielt om dei var uroleg og sprella.

Ved dei neste 3 prøvetakingane gjekk det raskare. Kor mange prøvar ein skulle ta blei redusert, noko som bidrog til mindre tidsbruk. Me som tok prøvane fekk betre teknikk og produsentane blei jamt over flinkare til å halde lamma i ro. Lamma var større og blodkara lettare å treffe.

Eit prosjekt som dette krev motiverte bønder som er villig til å setja av ein del tid til prøvetakinga kvar månad. Dei må ikkje berre vere med under sjølve prøvetakinga for å halde dyra for oss; Dei skal på førehand ha samla dyra inn og sjå til at alle som skal vera med er på plass. Prøvetakinga skal passe for både veterinærstudent innimellom undervisning og jobb, og for produsent innimellom alle gjeremåla gjennom sommaren. Dette gjorde at ein måtte vera fleksibel med tidspunkt for prøvetaking. Dermed kunne denne strekke seg over 5 dagar.

Det å bruke fecesprøvar til å diagnostisera leveriktar har me erfart at ikkje er ein eigna metode for å oppdage tidleg smitte av leveriktar. Som tidlegare beskrive i oppgåva tek det minimum 2 månadar, ofte lengre, frå dyret blir smitta til parasitten byrjar å skilje ut egg ein kan påvise i avføring. Sensitiviteten for sedimentasjonstest er lågare enn for ELISA frå IDEXX. Ved ein prøve på 10 g er sensitiviteten 63% for sedimentasjonstesten og ved 4 g prøvemateriale er sensitiviteten berre 43% (Charlier et al., 2008).

Blodprøvar der ein brukar ELISA er betre eigna til å fange opp tidleg smitte, då ein kan oppdage smitte allereie 2-4 veker etter dyra er blitt smitta (Williams et al., 2014) og sensitiviteten er 100% allereie 4 veker etter infeksjon (Kuerpick et al., 2013; Munita et al., 2019a). ELISA-testen som blei brukt er likevel ein grov test med ein svært høg fortynning. Dette kjem fram i tabell 3 som visar variasjonen mellom ulike brønnar når det blei køyrd trippeltar av 10 utvalde blodprøvar. Av desse 10 fekk 6 same resultat då dei blei køyrd om igjen, både når ein ser på gjennomsnittet av S/P%-verdiane og resultatet for kvar av dei tre brønnane i tripletten. Prøvane til A1-2 og G5-1 endar begge opp med det same resultatet til slutt, men har ein trippettverdi som gjev annleis resultat enn opphaveleg prøve og dei andre trippettverdiane. For I3-2 blir resultatet endra frå positiv til negativ prøve, både når ein ser på gjennomsnittet av dei 3 tripletane og at 2 av 3 trippeltar gjev ein S/P%-verdi som svarar til negativ prøve. Prøven til E2-2 får likt resultat om ein ser på resultatet for kvar trippettprøve, der 2 av 3 blir positiv som den opphavelege prøva. Ser ein derimot på gjennomsnittet (29,7) blir resultatet endra frå positiv til knapt negativ prøve. Her får den eine negative tripletten med S/P%-verdi på 19,1 stor betydning for gjennomsnittet i motsetning til dei andre to trippettverdiane (37 og 33) som og ligg nærmare verdien frå den opphavelege prøven (34,8). Resultatet for kvar trippett visar at 9/10 får likt utfall i trippett og opphaveleg prøve. 2 av prøvane har CV [coefficient of variation] som er mellom 20% og 30%. Dette er akseptabelt, men blir sett på som låg presisjon. CV over 30% blir sett på som uakseptabel (Couto et al., 2013). Med så få parallelle prøvar kan feil ved ein prøve gje stort utslag og ein kunne haft fleire parallelle for å få eit sikrare resultata. Variasjonen kan komme av feil mengde serum pippetert, inkubasjonstid, därleg risting av brett og därleg vasking av brett for å nemne nokre faktorar.

Beitebruk og behandling

I ettertid har me tenkt at det hadde vore nyttig å ta avføringsprøvar av mødrene ved første prøvetaking i mai. Om det er sauene som smittar ut beitet på sommaren og ikten må gjennom den ukjønna formeiringa i damsniglane før lamma får i seg metacercariane, eller om det er cercariar som har overvintra i sniglar som bidreg til tidleg smitte av lamma med metacercarier er ikkje klarlagt. I fleire av besetningane er det blitt behandla med Fasinex® i løpet av vinteren, så avføringsprøvane frå desse besetningane skulle difor ikkje innehaldt ikteegg i mai om dyra har gått inne heile vinteren og behandlinga hadde hatt den effekten ho skulle. Dette vil vere avhengig av når dei har behandla dyra og korleis beitebruk er gjennom vinteren.

Behandling og beitebruk gjennom vinteren har me ikkje fokusert så mykje på i denne oppgåva, blant anna fordi me ikkje har avføringsprøvar frå sauene i mai. Triklabendazol har effekt allereie 2 dagar etter smitte (*Parasittmidler*, 2017), men det er anbefalt å behandle 2 veker etter innsett om hausten (Domke et al., 2017) og til dømes ei behandling same dag som innsett kan gjere at ein ikkje får tatt alle parasittane. Dei parasittane som er igjen i dyret vil då kunne utvikle seg vidare i dyret gjennom vinteren og skilje ut egg det neste året. Desse dyra vil bidra til å smitte beite. Får dyra gå inn og ut som dei vil utover hausten og vinteren, kan dei få i seg smitte så lenge det er infektive metacercarier igjen på beitet, og dei kan dermed bli smitta på ny etter behandling på hausten. For at legemidla skal ha optimal effekt må ein dosere rett til kvart enkelt dyr og vere sikker på at dyra har fått i seg den dosen dei skal ha. Feil oppbevart legemiddel eller legemiddel som er utgått på dato kan ein ikkje vera sikker på har dei eigenskapane dei skal ha, og ein vil risikere at behandlinga ikkje har hatt effekt på parasittane. Om behandling var optimal kunne positive leverikteprøvar etter behandling i så fall vore teikn på resistens mot triklabendazol.

Avgrensingar ved studiet

Forsøksdyrpopulasjon

Forsøkspopulasjonen er frå 12 besetningar i 4 kommunar, som alle har ulike produksjonsoppsett. Ulikskapar mellom besetningane er blant anna storlek, saueraise, lengde på lamming, tid for beiteslepp, behandlingsrutinar, beitetypen og beiterutinar. Alle besetningane er likevel frå et relativt lite, konsentrert område på Vestlandet og ein kan anta at det er òg mange likskapar mellom dei.

Forsøksdyrpopulasjonen, lamma og soyene, blir vald ut på bakgrunn av kva dyr i besetningen som skulle gå på heimebeite, dette for å gjera det mogleg å ta prøvar jamleg. Dette kan ha hatt noko å sei for kor representativt utvalet av dyr har vore samanlikna med heile besetningen, då dyr som går på heimebeite kan skilje seg ut frå dyra som går på utmarksbeite. Denne forskjellen har vi vurdert til å vera minimal då dyra som vart vald ut til forsøket har vore i god allmenntilstand gjennom heile perioden. Ein anna faktor er at smittepresset på heimebeite og utmarksbeite truleg er forskjellig, og resultata vi får vil difor berre vera representativt for dyr som går på heimebeite.

I nokre besetningar var det ein høgare del fjorlam som gjekk på heimebeite og difor vart mange fjorlam med i forsøksutvalet. Dette kan ha ein effekt på maternale antistoff målt hjå lam. Hjå storfe veit ein at førstegongsfødande generelt produsera därlegare kvalitet på råmjølka enn eldre, og ein kan då anta at dette òg gjeld for sau (Chuck et al., 2017; *A guide to colostrum and colostrum management for dairy calves*, 2001; Kehoe et al., 2011). Vi har vurdert dette til å ha lite å sei for vår oppgåve då fokuset i denne oppgåva har vore å påvise ein eventuell smitte og ikkje kor godt rusta lamma er for å stå i mot ein eventuell infeksjon av leveriktar.

Bømlo og Stord ligg heilt ute ved kysten og ein kan anta at det blir meir påverka av ekstremvær enn Ryfylke (Hjelmeland og Stavanger kommunar). Bømlo og Stord kan vere

meir utsett for fuktig ver, men ha lågare gjennomsnittstemperatur enn Ryfylke, noko som påverkar livssyklusen til leveriktar på kvar sin måte. Likevel har områda med dei ulike besetningane i forsøket nok så like klimatiske førehald og me vil ikkje ta omsyn til eventuelle variasjonar i klima mellom desse områda i konklusjonane.

Dei klimatiske forholda på Sørvestlandet er spesielle grunna mykje nedbør og høg gjennomsnittstemperaturar gjennom vår og sommar. Dette gjere området spesielt gunstig for leverikten (Gjerde, 2011). Då topografien, nedbørsmengda og temperaturen varierar mellom Sørvestlandet og andre område i Noreg, bør ein ikkje overføre resultata for prevalens frå dette prosjektet til alle sauehald. Overføring av maternale antistoff er ikkje avhengig av landskap og vêr, og vil kunne vere gjeldande for heile landet.

Lamma som vert vald ut som forsøkspopulasjon var av ulik aldersgruppe, kor det var over ein månad skilnad i alder mellom dei eldre og dei yngste. Dette kan ha spelt ein rolle i både når ein kunne påvise eventuelle maternale antistoff i serum samt korleis individua responderte på ein eventuell leverikteinfeksjon. Men, antistoffoverføring er endå eit felt innan veterinærmedisin som krev meir studie og som enda er veldig usikkert (Bodjo et al., 2006; McQuoid et al., 1995). Dei eldste lamma vil ha en reduksjon i maternale antistoff tidlegare på sommaren enn dei yngste lamma, noko som har mykje å sei for kva antistoff ein målar når; Målar ein dei maternale antistoffa eller målar ein lamma sine eigenproduserte antistoff? Alder har òg mykje å sei for korleis lamma responderer på ein eventuell infeksjon mot leveriktar då dei yngste lamma endå vil kunne ha maternale antistoff i perioden smittepresset frå leveriktar er på sitt høgaste, imens dei eldste lamma vil ha ein høgare eigenproduksjon av antistoff i same periode. Men, kor mykje dette har å sei for resultata i denne oppgåva er usikkert då målemetodane og resultata våre i all hovudsak har vore fokusert på å påvise ein infeksjon, og ikkje fokusert på samanhengen mellom infeksjonsdose og antistoffsvar.

Utvalsstorleik

Ved første prøvetaking i mai blei det tatt prøve av 120 sauер og 240 lam, til saman 360 individ. Grunna mykje arbeid ved analysering av prøvene blei det bestemt at utvalstorleiken skulle redusere til totalt 120 lam. Ein slik reduksjon av utvalsstorleiken på 50% har mykje å sei for kor representative resultata faktisk er for heile besetninga og er difor ein eventuell årsak til skeivskap, en bias. Ein utvalsstorleik på 10 lam utgjer berre 2% av lamma i besetningen i nokon av dei største besetningane som var med i prosjektet. Dette gjere resultatet mindre generaliserbart og då òg därlegare validitet. Ein positiv prøve, ein feiltatt prøve eller ein øydelagt prøve i eit så lite utval ha mykje å seie for variasjonen.

For å mest mogleg unngå seleksjonsbias blir resultata for prevalens og infeksjonstidspunkt avgrensa til å vere gjeldande for sauehald på Sørvestlandet. Resultata for overføring av maternale antistoff kan ein anta er nokså likt over heile Noreg. Då besetningane som er med i prosjektet berre er frå 4 kommunar på Sørvestlandet, kan det endå vera noko bias og validiteten vil då vera noko därlegare enn om ein hadde hatt eit større utval som hadde omfatta fleire kommunar/områdar. Både storleiken på utvalet og det faktumet at utvalet berre kjem frå fire ulike kommunar gjer at resultata for prevalens og infeksjonstidspunkt er noko vanskeleg å generalisere, og validiteten er difor lågare om resultata skal gjelde for sauehald utanfor Bømlo, Stord og Ryfylke.

Prøvetakingstidspunkt

Alle prøvene ble tatt første uka i kvar månad (mai til august), då med eit intervall på om lag 30 dagar mellom prøvetakingane. I arbeidet for å bestemme når lamma tidlegast blir smitta eller når smittepresset er høgst opplev vi at eit slikt intervall (ca 30 dagar) er for langt. I etterkant ser vi at det hadde vore meir ønskeleg med hyppigare prøvetaking, spesielt gjennom juli, for å kunne vore meir sikker på og få eit meir spesifikt svar på når smittepresset er størst.

Faktorar som bidrar til variasjon i S/P%-verdien mellom flokkane

Metode ved blodprøvetaking og oppbevaring av prøvar

Prøvetaking ble gjort over fleire dagar og oppbevart i kjøleskap frem til sending. Blodprøvane ble sendt ubehandla (ikkje centrifugert og ikkje tatt ut serum), noko som gjer dei meir sårbar for skade, t.d. hemolyse. Ein kan tenkja seg at dette i nokon tilfelle kan ha påverka eventuelle antistoff i serum og ha gitt eit anna resultat enn kva som er det reelle. Dette er ein type informasjonsbias vi var klare over før prosjektet starta, og som har vore vanskeleg å gjera noko med grunna mangel på centrifugeringsutstyr hjå studentane.

Analysering av blodprøvar

ELISA-testen blei køyrd av 3 studentar for å fordela arbeidsmengda og sikre erfaring for alle oss studentar. Dette kan ha ført til små variasjonar i inkubasjonstid som til slutt kan ha påverka dei optiske verdiane for prøvane. For å kunne få eit sikrare resultat kunne alle bretta blitt køyrd av same person.

For å gjera resultata sikrare og i større grad unngå informasjonsbias kunne me ha køyrd alle prøvar som triplettar og rekna ut middelverdien. Dette ville ført til større kostnadar og meir arbeid enn kva meinte var mogleg for dette prosjektet.

Dei fleste reagensane i ELISA-settet var utan farge, noko som stilte krav til god konsentrasjon for å sikre at ein hadde reagens og prøvemateriale i rett brønn. Feilpipetting som blei oppdaga blei notert med brønn-nummer, slik at ein kunne gå tilbake og køyre prøven på nytt. Avgrensa tilgang på laboratorieutstyr og små marginar på inkubasjonstid (+/- 3 minutt) for kritiske punkt som stoppreagenset (IDEXX), gjorde at ein måtte planlegge bruk av maskiner og pipettar når fleire brett blei køyrd samtidig for å ikkje påverke S/P%-verdi.

Vidare arbeid

Det krev enda mykje arbeid for å få ein betre oversikt over kor stor leverikeproblematikken er i Noreg. Det er lite forsking på korleis parasitten utviklar seg, smittar og påverkar dyret under norske førehald, og behandlingsregimer er difor òg veldig varierande. Mange besetningar baserer sine tiltak mot leverikten på historikk og tradisjon, og gjerne ikkje på kva som faktisk er tilstanden i besetninga. Jamlege prøvar for parasittpåvising i buskapen er mange plassar i Noreg endå ikkje godt implementert og ein kan i desse tilfella anta at behandlingsregime då ikkje er optimalt. For å unngå feilbehandling og for redusere faren for utvikling av resistens må ein difor sette meir fokus på korleis ein skal ta tak i leverikteproblematikken her i landet, og eit generelt fokus på parasittar i norske produksjonsdymiljø er viktig. Dette krev økt fokus både frå veterinærar, produsentar og næringa generelt.

Kva behandlingsregime som er best egna under norske førehald er også mykje usikkert då anbefalingane er mange. Når, kor ofte og kva ein skal behandla med vil vera ulikt før ulike buskapar, og krev ein god forståing for førehalda i området og kor utbreidd parasitten er i området. Slik forsking er enda mangefull her til lands. Burde det i nokon tilfelle bli tilbydt og brukt vaksine om den blir kommersielt tilgjengeleg? Og, kor effektiv vil ein slik vaksine vera under norske førehald?

For å sikrare kunne estimere kor lenge lamma har maternale antistoff bør ein ta hyppigare prøvar i besetningar med kjent overføring av antistoff for å estimere halveringstid og varighet av ei eventuell beskyttelse lamma vil ha frå maternale antistoff.

Det som er viktig å nemne som ein bidragsytar til dei mange råda innan behandling mot parasittar er den auka tendensen til å søke råd på internett i staden for å forhøyra seg med sin lokale veterinær. I dag er det eit tallaust ulike nettmiljø og facebookgrupper kor ein kan søkje råd hjå andre medlem. Dette kan vera ein stor kjelde til usikkerheit og i verste fall

feilbehandling. Nettopp derfor bør ein få meir kunnskap som er tilgjengeleg og lettforståeleg for produsentar.

Det er generelt ein forståing om at *Fasciola* er særleg eit problem i våre kystnære områdar i Sør-Noreg då det er der er eit veldig fuktig og generelt et jamt varmt klima, noko som er gunstig for parasitten. Men, med ein generelt økt gjennomsnittstemperatur i verda i dag (global oppvarming), korleis vil førekomensten av leverikten endre seg framover om vi bevegar oss meir nord i landet? Er leverikten eigentleg eit større problem enn kva ein antar? Og, har det ein større innverknad på dyrevelferd og tilvekst enn kva ein har fokus på i dag?

Konklusjon

Hjå lamma i dei utvalde besetningane på Sørvestlandet finn ein positive prøvar for antistoff mot *F. hepatica* i mai, juni, juli og august. Resultata viser at maternale antistoff blir overført frå søye til lam. Antistoffverdiane økk så gradvis, før mange av lamma får ein stigning i antistoffverdiar i august. Både lam som var negative og lam som var positive for (maternalt overført) antistoff i mai viser stigning i antistoff og positivt resultat i august, noko som tyder på dei i hovudsak blir infisert av *F. hepatica* i juli. Eit lam viste stigning i antistoff i juli, noko som kan indikere at tidlegare infeksjon kan førekomme.

Takk til bidragsytarar

Prosjektet hadde ikkje vore mogleg hadde det ikkje vore for dei 12 produsentane som har stilt besetninga og tida si til disposisjon, hjelpt til ved prøvetaking og som elles har vore tilgjengeleg under heile forsøksperioden. Vi vil rette ein stor takk til alle produsentane. Vi vil òg rette ein stor takk til Wenche Okstad og Siri Hamre Bjerkreim frå Høyland som har analysert alle avføringsprøvane, tatt imot og lagra alle serumprøvane, og som gav oss opplæring i analysemetodar og laboratoriearbeit i sluttfasen av prosjektet. Frå NMBU vil vi takke rettleiarane våre Snorre Stuen, Lucy Robertson og Kristoffer Tysnes for å la oss ta del av dette arbeidet med *Fasciola hepatica*, og for hjelp av planlegging og gjennomføring oppgåva. Vi er også svært takknemleg til alle andre som har gitt gode innspel i skriving av oppgåva, hjelpt til under prøvetaking og analysering, og som elles har disponert tida si for å hjelpe til med oppgåva.

Summary

Title: Time of *Fasciola hepatica* Infection in Lambs in Selected Sheep Farms in the South West of Norway.

Authors: Tor Olav Blekenberg, Karianna Laugaland, Julie Nedrebø Johannessen

Supervisors: Snorre Stuen, Department of Production Animal Clinical Sciences

Lucy Robertson and Kristoffer Tysnes, Department of Paraclinical Sciences

In this study faecal and blood samples were collected from ewe and lambs in 12 selected farms in South West Norway. Blood samples from ewes (n=120) in May and from lambs in May (n=240), June, July and August (n=120) were analysed for antibodies against *Fasciola hepatica* by ELISA. Faecal samples collected from lambs in August and October were analysed for fluke eggs.

The ELISA results indicate that antibodies transferred in colostrum from ewe to lambs and were detectable for at least 16 weeks. The antibody levels decreased during summer, before increasing again in some farms in July and August. These data indicate that the lambs have been infected with *F. hepatica* on pasture and have developed their own antibodies against this trematode.

Fluke eggs were not detected in faecal samples collected in August but were detected from samples from three farms in October.

Serum samples can be used to detect infection earlier than faecal samples. Time of infection varies between farms. In some lambs only the presence of maternal antibodies was demonstrated, while in other lambs only antibodies resulting from infection were shown. For a few lambs both maternal antibodies and, later, their own antibodies against *F. hepatica* were demonstrated. The earliest observed increase in antibody levels was in July (n=1), and for most lambs occurred in August (n=28).

Referansar

- Ballweber, L. R. (2014). *Fasciola hepatica in Ruminants*. Tilgjengelig fra: <https://www.merckvetmanual.com/digestive-system/fluke-infections-in-ruminants/fasciola-hepatica-in-ruminants> (lest 18.11.20).
- Beesley, N. J., Caminade, C., Charlier, J., Flynn, R. J., Hodgkinson, J. E., Martinez-Moreno, A., Martinez-Valladares, M., Perez, J., Rinaldi, L. & Williams, D. J. L. (2018). *Fasciola and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs.* *Transbound Emerg Dis*, 65 (S1): 199-216. doi: 10.1111/tbed.12682.
- Bodjo, S. C., Couacy-Hymann, E., Y.Koffi, M. & Danho, T. (2006). Assessment Of The Duration Of Maternal Antibodies Specific To The Homologous Peste Des Petits Ruminant Vaccine "Nigeria 75/1" In Djallonké Lambs. *Biokemistri*, 18 (2): 99-103. doi: 10.4314/biokem.v18i2.56408.
- Boray, J. C. (1966). Studies on the relative susceptibility of some lymnaeids to infection with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* and on the adaptation of *Fasciola* spp. *Ann Trop Med Parasitol*, 60 (1): 114-24. doi: 10.1080/00034983.1966.11686394.
- Boray, J. C. & Love, S. (2017). *Liver fluke disease in sheep and cattle*: NSW Department of Primary Industries. Tilgjengelig fra: https://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0004/114691/liver-fluke-disease-in-sheep-and-cattle.pdf.
- Brockwell, Y. M., Elliott, T. P., Anderson, G. R., Stanton, R., Spithill, T. W. & Sangster, N. C. (2014). Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 4 (1): 48-54. doi: 10.1016/j.ijpddr.2013.11.005.
- Charlier, J., Duchateau, L., Claerebout, E., Williams, D. & Vercruyse, J. (2007). Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Prev Vet Med*, 78 (1): 57-66. doi: 10.1016/j.prevetmed.2006.09.010.
- Charlier, J., De Meulemeester, L., Claerebout, E., Williams, D. & Vercruyse, J. (2008). Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Vet Parasitol*, 153 (1-2): 44-51. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.01.035.
- Chauvin, A., Bouvet, G. & Boulard, C. (1995). Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int J Parasitol*, 25 (10): 1227-41. doi: 10.1016/0020-7519(95)00039-5.
- Chuck, G. M., Mansell, P. D., Stevenson, M. A. & Izzo, M. M. (2017). Factors affecting colostrum quality in Australian pasture-based dairy herds. *Aust Vet J*, 95 (11): 421-426. doi: 10.1111/avj.12643.
- Constable, P., Hinchcliffe, K. W., Done, S. H. & Grünberg, W. (2017). *Veterinary medicine : A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats : 1. 11th ed. ib. utg. Veterinary medicine, b. Vol 1 Revised index attached.* St.Louis: Elsevier.
- Couto, M. F., Pternelli, L. A. & Barbosa, M. H. P. (2013). Classification of the coefficients of variation for sugarcane crops. *Ciência rural*, 43 (6): 957-961. doi: 10.1590/s0103-84782013000600003.
- Domke, A., Phytian, C. & Tømmerberg, V. (2017). *Tiltak mot store leverikter hos sau.* Tilgjengelig fra: <https://www.animalia.no/no/Dyr/sau/aktuelt--sau/tiltak-mot-store-leverikter-hos-sau/> (lest 26.10.20).

- Domke, A. V., Chartier, C., Gjerde, B., Leine, N., Vatn, S. & Stuen, S. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Vet Parasitol*, 194 (1): 40-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.023.
- Fairweather, I. (2011). Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Vet Parasitol*, 180 (1-2): 133-143. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.034.
- Fairweather, I., Brennan, G. P., Hanna, R. E. B., Robinson, M. W. & Skuce, P. J. (2020). Drug resistance in liver flukes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 12: 39-59. doi: 10.1016/j.ijpddr.2019.11.003.
- Fiss, L., Fiss, L., de Lourdes Adrien, M., de Lourdes Adrien, M., Marcolongo-Pereira, C., Marcolongo-Pereira, C., Assis-Brasil, N. D., Assis-Brasil, N. D., Sallis, E. S. V., Sallis, E. S. V., et al. (2013). Subacute and acute fasciolosis in sheep in southern Brazil. *Parasitol Res*, 112 (2): 883-887. doi: 10.1007/s00436-012-3096-2.
- Forskrift om bruk av legemidlar til dyr. (2017). *Forskrift om bruk av legemidler til dyr av 16. januar 2007 nr. 95*. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2007-01-16-50?q=legemidler%20dyr> (lest 1.12.20).
- Forskrift om legemiddelrester i næringsmidler fra dyr. (2012). *Forskrift om grenseverdier for legemiddelrester i næringsmidler fra dyr av 30.mai 2012 nr. 512*. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-05-30-512> (lest 24.10.20).
- Fthenakis, G. C., Mavrogianni, V. S., Gallidis, E. & Papadopoulos, E. (2015). Interactions between parasitic infections and reproductive efficiency in sheep. *Vet Parasitol*, 208 (1-2): 56-66. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.12.017.
- Gjerde, B. (2011). *Veterinærmedisinsk helmintologi*. 19. utg.
- A guide to colostrum and colostrum management for dairy calves. (2001). Bovine Alliance on Management & Nutrition. Tilgjengelig fra: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/bamn/BAMN01_Colostrum.pdf (lest 13.11.20).
- Hanssen-Bauer, I., Drange, H., Førland, E. J., Roald, L. A., Børshheim, K. Y., Hisdal, H., Lawrence, D., Nesje, A., Sandven, S., Sorteberg, A., et al. (2009). *Klima i Norge 2100. Bakgrunnsmateriale til NOU Klimatilpassing*. Norsk klimasenter.
- Hillyer, G. V. (2005). *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthol*, 79 (3): 241-247. doi: 10.1079/JOH2005304.
- IDEXX. *Fasciola hepatica Antibody Test Kit*. Upublisert manuskript.
- Jones, R. A., Brophy, P. M., Davis, C. N., Davies, T. E., Emberson, H., Rees Stevens, P. & Williams, H. W. (2018). Detection of *Galba truncatula*, *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi* environmental DNA within water sources on pasture land, a future tool for fluke control? *Parasit Vectors*, 11 (1): 342-342. doi: 10.1186/s13071-018-2928-z.
- Kehoe, S. I., Heinrichs, A. J., Moody, M. L., Jones, C. M. & Long, M. R. (2011). Comparison of immunoglobulin G concentrations in primiparous and multiparous bovine colostrum1. *The Professional Animal Scientist*, 27 (3): 176-180. doi: [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30471-X](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30471-X).
- Kendon, M., McCarthy, M., Jevrejeva, S., Matthews, A., Sparks, T. & Garforth, J. (2020). State of the UK Climate 2019. *International journal of climatology*, 40 (S1): 1-69. doi: 10.1002/joc.6726.
- Know Your Anthelmintics Groups. (2020). SCOPS. Tilgjengelig fra: <https://www.scops.org.uk/workspace/pdfs/anthelmintics-scops-lssc-web-version-2020.pdf> (lest 30.11.20).
- Kuerpick, B., Schnieder, T. & Strube, C. (2013). Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of

- antibodies against *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*, 193 (1-3): 206-13. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.11.021.
- Leverikter. (2017). Tilgjengelig fra: <https://www.animalia.no/no/Dyr/sauehelsenett/sjukdommer/lever/leverikter/> (lest 7.11.20).
- López-Díaz, M. C., Carro, M. C., Cadórñiga, C., Díez-Baños, P. & Mezo, M. (1998). Puberty and serum concentrations of ovarian steroids during prepuberal period in Friesian heifers artificially infected with *Fasciola hepatica*. *Theriogenology*, 50 (4): 587-593.
- Love, S. (2017). *Liver fluke - a review*. 3. utg. Primefact: New South Wales Governement, Departement of Primary Industries. Tilgjengelig fra: <https://wormmailinthecloud.files.wordpress.com/2017/05/liver-fluke-review-primefact-813-third-edition-love-s-2017-05-05.pdf> (lest 12.11.20).
- Martínez-Fernández, A. R., Nogal-Ruiz, J. J., López-Abán, J., Ramajo, V., Oleaga, A., Manga-González, Y., Hillyer, G. V. & Muro, A. (2004). Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet Parasitol*, 126 (3): 287-298. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.07.023.
- matematikk.org. *Regresjon I*. Tilgjengelig fra: https://www.matematikk.org/artikkel.html?tid=188202&within_tid=188178 (lest 17.11.20).
- McMahon, C., Edgar, H. W. J., Hanna, R. E. B., Ellison, S. E., Flanagan, A. M., McCoy, M., Kajugu, P. E., Gordon, A. W., Irwin, D., Barley, J. E., et al. (2016). Liver fluke control on sheep farms in Northern Ireland: A survey of changing management practices in relation to disease prevalence and perceived triclabendazole resistance. *Vet Parasitol*, 216: 72-83. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.11.018.
- McQuoid, M., Hodgkinson, A. & Hodgkinson, S. (1995, Jan). *Maternal antibodies and immune responsiveness in growing lambs*. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, s. 214-217: New Zealand Society of Animal Production.
- Mezo, M., González-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. *Veterinary Parasitology*, 168 (1): 36-44. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.007>.
- Molina-Hernández, V., Mulcahy, G., Pérez, J., Martínez-Moreno, Á., Donnelly, S., O'Neill, S. M., Dalton, J. P. & Cwiklinski, K. (2015). *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Vet Parasitol*, 208 (1-2): 101-111. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.01.004.
- Munita, M. P., Rea, R., Martinez-Ibeas, A. M., Byrne, N., Kennedy, A., Sekiya, M., Mulcahy, G. & Sayers, R. (2019a). Comparison of four commercially available ELISA kits for diagnosis of *Fasciola hepatica* in Irish cattle. *BMC Vet Res*, 15 (1): 414. doi: 10.1186/s12917-019-2160-x.
- Munita, M. P., Rea, R., Martinez-Ibeas, A. M., Byrne, N., McGrath, G., Munita-Corbalan, L. E., Sekiya, M., Mulcahy, G. & Sayers, R. G. (2019b). Liver fluke in Irish sheep: prevalence and associations with management practices and co-infection with rumen fluke. *Parasit Vectors*, 12 (1): 525-525. doi: 10.1186/s13071-019-3779-y.
- Neimark, H., Hoff, B. & Ganter, M. (2004). *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54: 365-71. doi: 10.1099/ijss.0.02858-0.

- Novobilsky, A., Christensson, D. & König, U. (2012). Stora leverflundran ifokus runt mötesbordet. *Svensk Vet*, 14: 26-29.
- Novobilský, A., Engström, A., Sollenberg, S., Gustafsson, K., Morrison, D. A. & Höglund, J. (2014). Transmission patterns of *Fasciola hepatica* to ruminants in Sweden. *Vet Parasitol*, 203 (3-4): 276-86. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.04.015.
- Novobilský, A., Amaya Solis, N., Skarin, M. & Höglund, J. (2016). Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 6 (3): 141-147. doi: 10.1016/j.ijpddr.2016.06.004.
- Overend, D. J. & Bowen, F. L. (1995). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J*, 72 (7): 275-6. doi: 10.1111/j.1751-0813.1995.tb03546.x.
- Parasittmidler. (2017). Animalia. Tilgjengelig fra: <https://www.animalia.no/no/Dyr/sauehelsenett/terapi/parasittmidler/> (lest 17.11.20).
- Relf, V., Good, B., Hanrahan, J. P., McCarthy, E., Forbes, A. B. & deWaal, T. (2011). Temporal studies on *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula* in the west of Ireland. *Vet Parasitol*, 175 (3-4): 287-292. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.10.010.
- Rushton, B. & Murray, M. (1977). Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. *J Comp Pathol*, 87 (3): 459-470. doi: 10.1016/0021-9975(77)90035-4.
- Sargison, N. (2008). *Sheep flock health : a planned approach*. Oxford: Blackwell Pub.
- Sargison, N. D. & Scott, P. R. (2011). Diagnosis and economic consequences of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica* in a sheep flock in south-east Scotland. *Vet Rec*, 168 (6): 159. doi: 10.1136/vr.c5332.
- Shah, M. M. & Mandiga, P. (2020). Physiology, Plasma Osmolality and Oncotic Pressure. I: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.

Sikveland, N. M. & Søyland, K. (2011). *Diagnostikk og infeksjonstidspunkt ved leverikteinfeksjon (fasciolose) hjå lam på Jæren*. Høyland feltstasjon: N.M.Sikveland, K.Søyland.

Toet, H., Piedrafita, D. M. & Spithill, T. W. (2014). Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int J Parasitol*, 44 (12): 915-27. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.07.011.

Tollersrud, T. & Tømmerberg, V. (2017). *Utvidet sjukdomsregistrering hos sau – tiltak ved funn*. Tilgjengelig fra: <https://www.animalia.no/no/Dyr/sau/utvidet-sjukdomsregistrering-hos-sau--tiltak-ved-funn/> (lest 11.11.2020).

Valero, M. A. & Mas-Coma, S. (2000). Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region. *Folia Parasitol (Praha)*, 47 (1): 17-22. doi: 10.14411/fp.2000.004.

Vaughan, J. *Liver Fluke in alpacas*. Tilgjengelig fra: <https://criogenesis.cc/wp-content/uploads/2015/11/CriGenesis-Fasciola-fluke1.pdf> (lest 8.11.20).

Weisenberg, E. (2015). *Fasciola*. pahologyoutlines.com. Tilgjengelig fra: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/colonfasciola.html> (lest 12.11.20).

Williams, D. *Efficacy of flukicides available for use in sheep in the UK against susceptible fluke populations*: SCOPS. Tilgjengelig fra: https://www.scops.org.uk/workspace/pdfs/flukicide-kill-rate-table_1.pdf?fbclid=IwAR16zgouS5BcyR1lgej7ddmTho7I2_ixxEj1s0iBEhxgPR9rS3gIAzOfo (lest 30.11.20).

Williams, D. J. L., Howell, A., Graham-Brown, J., Kamaludeen, J. & Smith, D. (2014). Liver fluke - An overview for practitioners. *Cattle Practice*, 22: 238-244.

Vedlegg 1 – S/P%-verdiar for sauер og lam i mai

Kvitt felt betyr manglar prøve, grøn negativ prøve og raud positiv prøve

Alder på lamma ved første prøvetaking merka med stjerne på sauenummer. * = ≤ 8 dagar

gammalt, ** = 8-21 dagar og *** ≥ 22 dagar.

Tabell 5 S/P%-verdiar for sauер og lam i besetning A-D i mai

Sau	S/P%	Lam	S/P%	Sau	S/P%	Lam	S/P%
A1***	168	A1-1	38	B1***	32	B1-1	25
		A1-2	73			B1-2	46
A2***	128	A2-1	71	B2***	147	B2-1	100
		A2-2	148			B2-2	69
A3***	117	A3-1	138	B3***		B3-1	0
		A3-2	134				
A4***	85	A4-1	62	B4***	24	B4-1	1
		A4-2	35			B4-2	1
A5***	169	A5-1	91	B5***		B5-1	7
		A5-2	68			B5-2	1
A6***	87	A6-1	150	B6**	20	B6-1	6
		A6-2	139				
A7***	176	A7-1	143	B7***	61	B7-1	2
		A7-2	152				
A8***	121	A8-1	109	B8***		B8-1	2
		A8-2	102			B8-2	4
A9***	154	A9-1	45	B9**	0	B8-3	3
		A9-2	10			B9-1	3
A10**	158	A10-1	93	B10***	0	B10-1	0
		A10-2	86			B10-2	0
						B10-3	1
C1***	125	C1-1	133	D1***	108	D1-1	12
		C1-2	140			D1-2	20
C2***	65	C2-1		D2***	120	D2-1	72
		C2-2	46			D2-2	69
C3***	54	C3-1	13	D3***	30	D3-1	2
		C3-2	16			D3-2	3
C4***	125	C4-1	51	D4***	178	D4-1	72
		C4-2				D4-2	35
C5***	108	C5-1	123	D5***	175	D5-1	128
		C5-2	110			D5-2	141
C6***	46	C6-1	27	D6***	82	D6-1	24
		C6-2	16			D6-2	20
C7***	123	C7-1	1	D7***	124	D7-1	45
		C7-2	0			D7-2	50
C8***	141	C8-1		D8***	173	D8-1	14
		C8-2				D8-2	32
C9***	156	C9-1	133	D9***	155	D9-1	114
		C9-2				D9-2	84
C10***	149	C10-1		D10**	79	D10-1	32
		C10-2				D10-2	12

Tabell 6 S/P%-verdiar for sauер og lam i besetning E-H i mai

Sau	S/P%	Lam	S/P%	Sau	S/P%	Lam	S/P%
E1***	171	E1-1	201	F1***	161	F1-1	148
		E1-2	210			F1-2	188
E2***	161	E2-1	255	F2**	128	F2-1	60
		E2-2	273			F2-2	71
E3***	146	E3-1	110	F3***	6	F3-1	3
		E3-2	89			F3-2	2
E4***	61	E4-1	26	F4***	145	F4-1	143
		E4-2	11			F4-2	139
E5***	187	E5-1	136	F5***	37	F5-1	20
		E5-2	257			F5-2	10
E6***	146	E6-1	11	F6***	61	F6-1	19
		E6-2	10			F6-2	25
E7***	72	E7-1	57	F7***	2	F7-1	0
		E7-2	42			F7-2	3
E8***	140	E8-1	88	F8***	74	F8-1	38
		E8-2	162			F8-2	41
E9***	67	E9-1	0	F9***	33	F9-1	8
		E9-2	2			F9-2	6
E10*	2	E10-1	7	F10**	38	F10-1	8
		E10-2	8			F10-2	8
G1***	1	G1-1	1	H1***	136	H1-1	72
		G1-2	0			H1-2	
G2***	1	G2-1	2	H2***	106	H2-1	6
		G2-2	1			H2-2	20
G3***	0	G3-1	1	H3***	175	H3-1	156
		G3-2	2			H3-2	
G4***	158	G4-1	90	H4**	143	H4-1	109
		G4-2	123			H4-2	
G5**	12	G5-1	6	H5**	163	H5-1	133
		G5-2	12			H5-2	137
G6***	0	G6-1	0	H6***	160	H6-1	100
		G6-2	0			H6-2	
G7***	0	G7-1	1	H7***	10	H7-1	3
		G7-2	1			H7-2	
G8***	0	G8-1	0	H8***	43	H8-1	7
		G8-2	0			H8-2	109
G9***	0	G9-1	0	H9**	3	H9-1	0
		G9-2	0			H9-2	0
G10*	2	G10-1	0	H10**	15	H10-1	6
		G10-2	10			H10-2	5

Tabell 7 S/P%-verdiar for sauер og lam i besetning I-L i mai

Sau	S/P%	Lam	S/P%	Sau	S/P%	Lam	S/P%
I1***	119,9	I1-1	5,3	J1***	4	J1-1	3
		I1-2	3,8			J1-2	1
I2***	85,4	I2-1	14,7	J2***	142	J2-1	65
		I2-2	9,0			J2-2	136
I3***	100,8	I3-1	4,9	J3***	47	J3-1	12
		I3-2	3,4			J3-2	16
I4***	138,6	I4-1	4,7	J4***	50	J4-1	50
		I4-2	1,0			J4-2	14
I5**	73,5	I5-1	15,0	J5***	5	J5-1	9
		I5-2	17,5			J5-2	2
I6***	50,4	I6-1	22,0	J6***	3	J6-1	0
		I6-2	44,5			J6-2	0
I7***	82,4	I7-1	14,3	J7***	1	J7-1	2
		I7-2	19,2			J7-2	1
I8***	123,9	I8-1	1,9	J8***	111	J8-1	
		I8-2	45,4			J8-2	19
I9***	103,0	I9-1	43,3	J9***	39	J9-1	5
		I9-2	6,4			J9-2	2
I10**	85,5	I10-1	45,8	J10***	65	J10-1	34
		I10-2	52,3			J10-2	18
K1***	13	K1-1	46	L1***	0	L1-1	0
		K1-2	36			L1-2	0
K2***	183	K2-1	172	L2***	0	L2-1	0
		K2-2	153			L2-2	1
K3***	0	K3-1	0	L3***	0	L3-1	0
		K3-2	0			L3-2	0
K4***	16	K4-1	8	L4***	1	L4-1	1
		K4-2	7			L4-2	2
K5***	62	K5-1	49	L5***	0	L5-1	0
		K5-2	5			L5-2	0
K6***	33	K6-1		L6***	0	L6-1	0
		K6-2	10			L6-2	0
K7***	1	K7-1		L7***	0	L7-1	0
		K7-2				L7-2	0
K8***	0	K8-1	0	L8***	0	L8-1	0
		K8-2	0			L8-2	0
K9**	43	K9-1		L9***	0	L9-1	0
		K9-2	18			L9-2	
K10**	189	K10-1	177	L10***	0	L10-1	0
		K10-2	123			L10-2	2

Vedlegg 2 – S/P%-verdiar til lamma mai til august

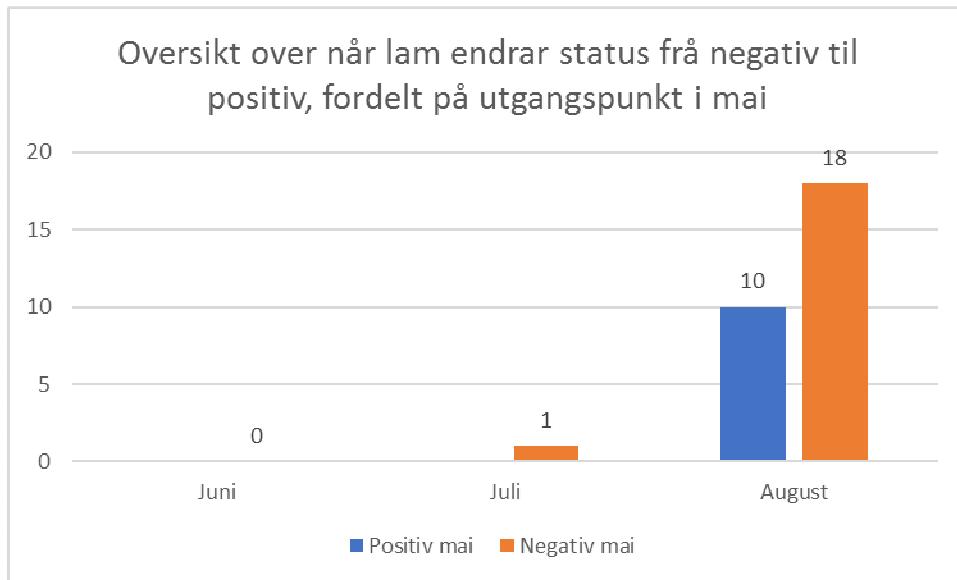
Tabell 8 Besetning A-F, S/P%-verdiar mai til august

	Mai	Juni	Juli	August			Mai	Juni	Juli	August	
A1-1	38	20	6	67			B1-1	25	0	1	0
A1-2	73	37	7	23			B1-2	46	0	0	0
A2-1	71	25	14	0			B2-1	100	59	38	5
A2-2	148	106	42	16			B2-2	69	47	29	3
A3-1	138	95	31	93			B3-1	0	0	0	0
A3-2	134	93	37	22			B4-1	1	4	2	1
A4-1	62	26	2	123			B4-2	1	2	2	0
A4-2	35	12	3	77			B5-1	7	1	0	0
A5-1	91	38	1	143			B5-2	1	0	0	1
A5-2	68	38	3	49			B6-1	6	1	0	0
C1-1	133	71	18	115			D1-1	12	6	1	3
C1-2	140	81	14	2			D1-2	20	10	86	152
C2-1		4	2	0			D2-1	72	40	5	1
C2-2	46	10	1	0			D2-2	69	40	6	0
C3-1	13	9	2	123			D3-1	2	2	0	0
C3-2	16						D3-2	3	1	0	61
C4-1	51	20	2	0			D4-1	72	14	3	136
C5-1	123	77		6			D4-2	35	16	3	0
C5-2	110	65		32			D5-1	128	93	12	0
C6-1	27		0				D5-2	141	111	25	0
C6-2	16		1								
C7-1	1	19	5	0							
C7-2	0	20	0	158							
E1-1	201	57	42	12			F1-1	148	29	16	2
E1-2	210	86	26	6			F1-2	188	40	14	20
E2-1	255	131	72	34			F2-1	60	16	5	0
E2-2	273	129	64	35			F2-2	71	11	0	0
E3-1	110	19	3	0			F3-1	3	3	0	1
E3-2	89	5	3	0			F3-2	2	2	0	57
E4-1	26	6	0	0			F4-1	143	75	14	136
E4-2	11	3	2	143			F4-2	139	62	12	1
E5-1	136	48	11	2			F5-1	20	5	0	54
E5-2	257	144	86	33			F5-2	10	2	1	30

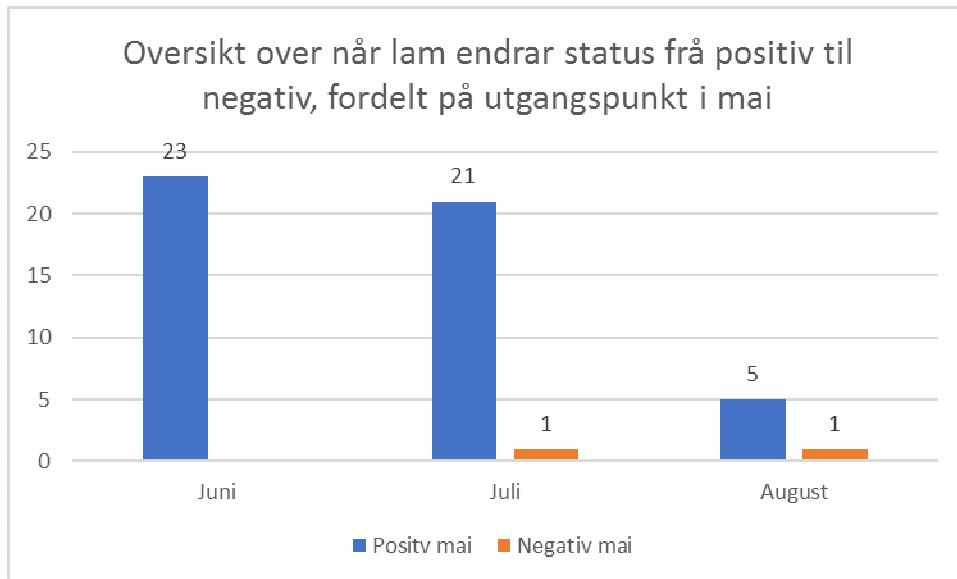
Tabell 9 Besetning G-L, S/P%-verdiar mai til august

	Mai	Juni	Juli	August		Mai	Juni	Juli	August
G1-1	1	0			H1-1	72	10	5	7
G1-2	0	0	0	0	H1-2		2	1	121
G1-1	2	0	1	1	H2-1	6	1	1	59
G2-2	1	0	0	0	H2-2	20	6	2	0
G3-1	1	0	1	85	H3-1	156	72	28	97
G3-2	2	0	0	0	H3-2		44	19	65
G4-1	90	5	2	1	H4-1	109	28	9	0
G4-2	123	6	1	0	H4-2		27	7	0
G5-1	6		0	37	H5-1	133	34	22	4
G5-2	12	1	0	0	H5-2	137	60	30	7
I1-1	5	7	3	146	J1-1	3	1	0	0
I1-2	4	8	4	139	J1-2	1	1	1	0
I2-1	15	11	5	99	J2-1	65	45	15	1
I2-2	9	13	7	157	J2-2	136	74	27	1
I3-1	5	5	1	1	J3-1	12	5	2	0
I3-2	3	3	1	36	J3-2	16	8	6	0
I4-1	5	10	2	100	J4-1	14	13	2	0
I4-2	1	3	0	125	J4-2	3	0	0	0
I5-1	15	3	4	1	J5-1	9	2	1	0
I5-2	17	16	4	0	J5-2	2	4	1	0
K1-1	46	17	6	1	L1-1	0			0
K1-2	36	18	6	0	L1-2	0			0
K2-1	172	105	41	7	L2-1	0			0
K2-2	153	148	98	19	L2-2	1			1
K3-1	0	0	0	0	L3-1	0			0
K3-2	0	0	0	0	L3-2	0			0
K4-1	8	2	1	0	L4-1	1			1
K4-2	7	3	1	0	L4-2	2			0
K5-1	49	22	11	0	L5-1	0			0
K5-2	5	5	3	1	L5-2	0			0

Vedlegg 3 – Endring av status gjennom beitesesongen

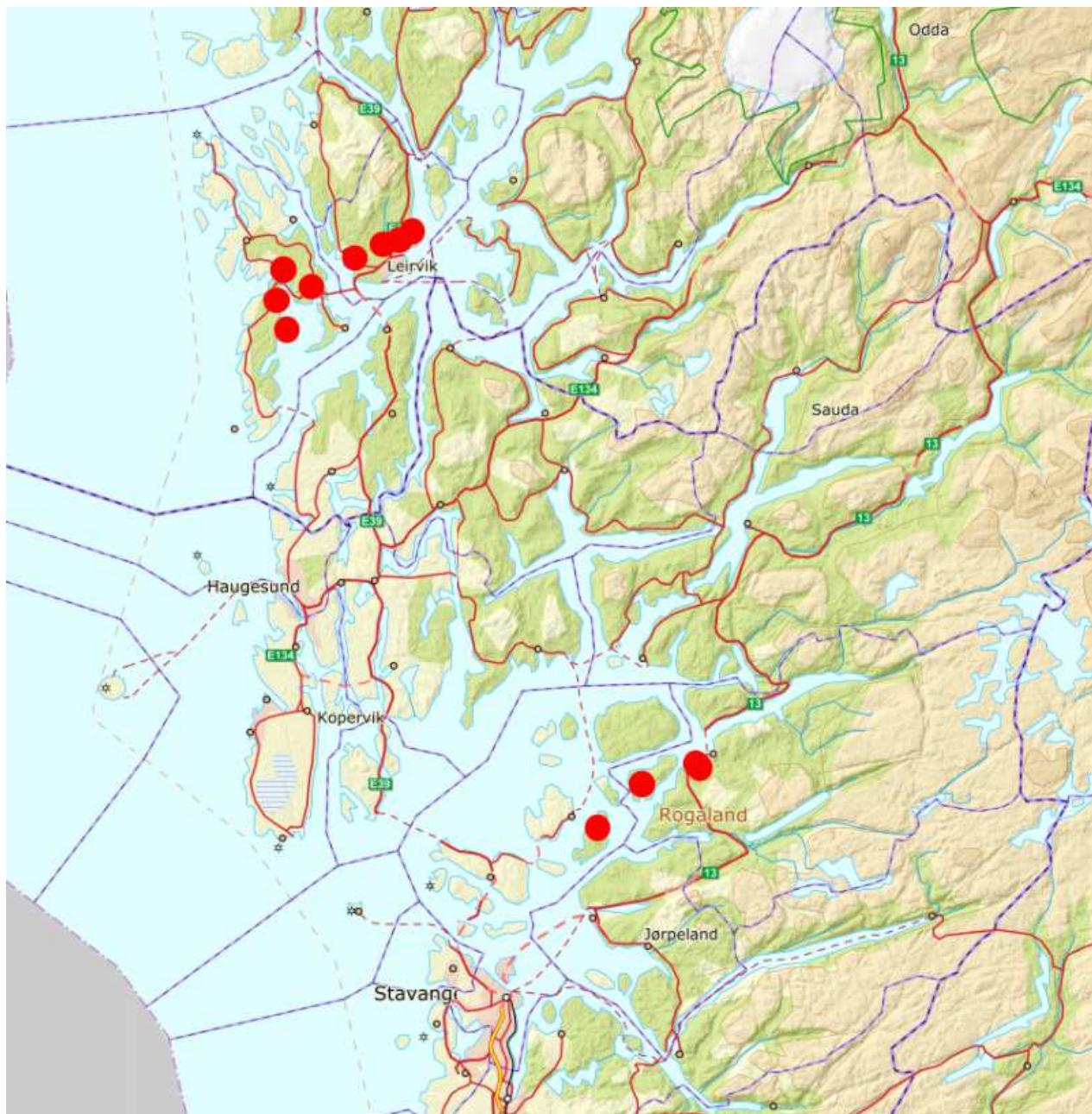


Figur 29 Tal lam klassifisert som positiv, gitt at dei var negative ved prøvetaking månaden før. Samt fordelt på smittestatus i mai (blå = positiv i mai, oransje = negativ i mai)

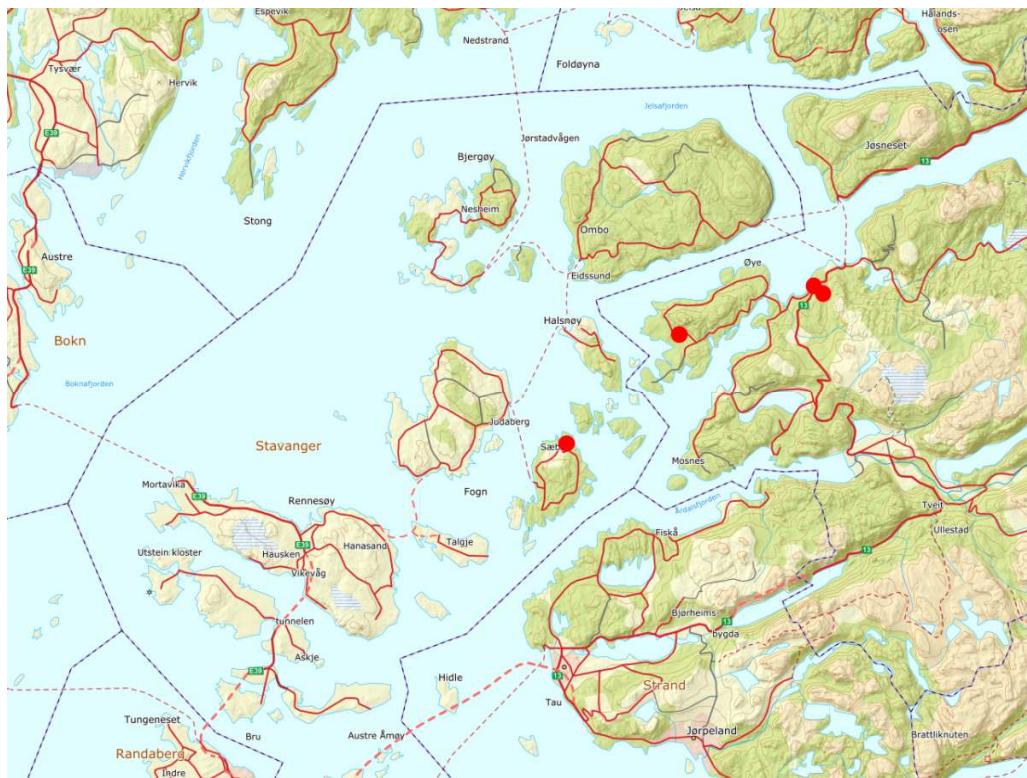


Figur 30 Tal lam klassifisert som negativ, gitt at dei var positive ved prøvetaking månaden før. Samt fordelt på smittestatus i mai (blå = positiv i mai, oransje = negativ i mai)

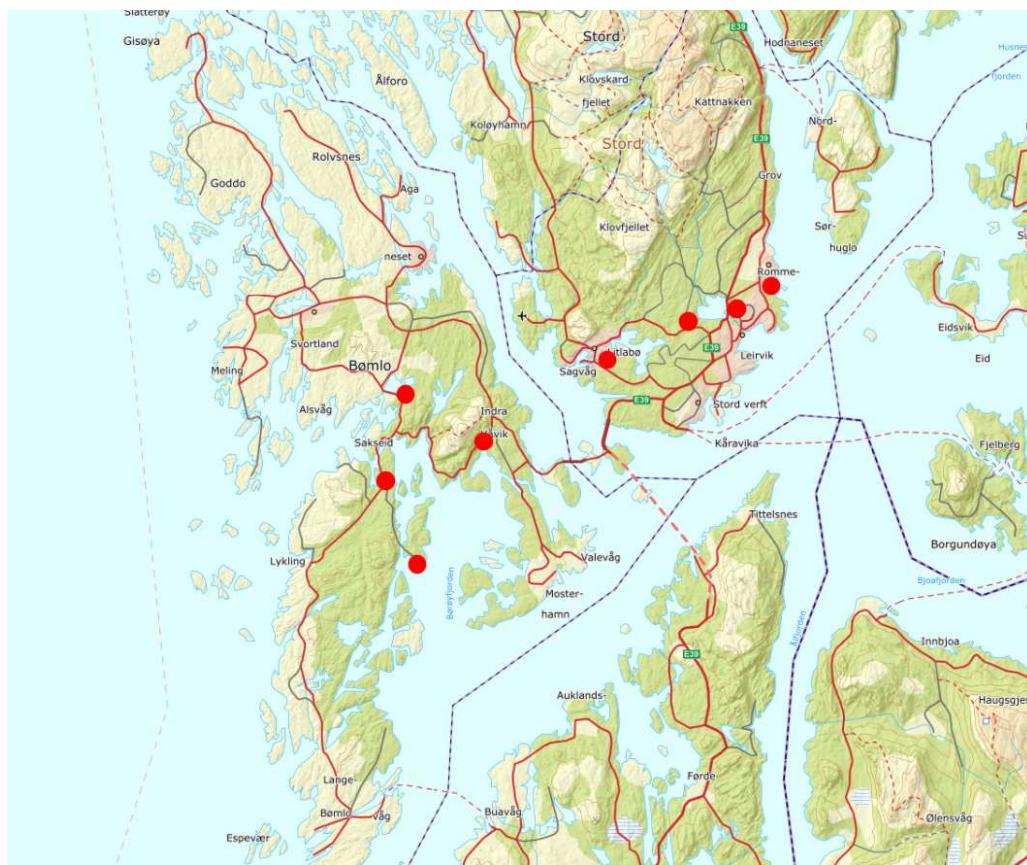
Vedlegg 4 – kart over besetningane i prosjektet



Figur 31 Plassering av alle besetningar i prosjektet



Figur 32 Besetningane i Hjelmeland og Stavanger kommunar



Figur 33 Besetningar i Stord og Bømlo kommunar



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no