

SLUTRAPPORT

Fästingburna sjukdomar – ett hot mot betande nötkreatur i ett varmare klimat

Karin Persson Waller, SVA (huvudsökande)

BAKGRUND

Klimatförändringen leder till kortare vintrar och färre frost dagar, främst i södra delarna av landet, vilket i sin tur leder till längre växtsäsong samt betesperiod och kan möjliggöra att fler besättningar håller djuren ute året om. Det kan också bli aktuellt att använda betesdjur för skötsel av marker som inte tidigare använts för detta ändamål.

Ökad medeltemperatur med mildare vintrar och mindre snötäcke och förlängd växtsäsong leder tyvärr också till bättre förutsättningar för fästingarnas överlevnad och förökning. Fästingar livnär sig på att suga blod från både vilda djur och tamdjur som till exempel betande nötkreatur. *Ixodes ricinus* är den vanligaste fästingarten i Sverige och är vektor för flera infektioner som leder till sjukdomar hos betesdjur och människor. Hos nötkreatur är betesfeber (anaplasmos) en av de mest kända i Sverige. Denna sjukdom orsakas av bakterien *Anaplasma phagocytophilum*. En annan fästingburna sjukdom hos nötkreatur är sommarsjuka eller babesios orsakad av parasiten *Babesia divergens*. Fästingar kan även bära på andra infektionsämnen vars betydelse i många fall inte är helt klarlagd. Det är också möjligt att saminfektioner kan förvärra sjukdomsförloppet vid anaplasmos. Det förekommer även exotiska fästingarter som ännu inte är endemiska i Sverige som potentiellt kan leda till introduktion av nya infektionsämnen vilka kan orsaka nya sjukdomar och/eller genom saminfektioner förvärra sjukdomsförloppet för kända sjukdomar. Fästingburna infektioner bland betande djur är svåra att kontrollera eftersom vilda djur kan agera som reservoarer för infektionsämnen och som värddjur för fästingar. I värsta fall kan fästingburna infektioner bli ett hot mot att hålla betande nötkreatur i vissa områden.

I början av 2020 drabbades en besättning med utegående nötkreatur i Skåne av allvarlig sjukdom och dödsfall bland ungdjur och kalvar. Symtomen varierade men omfattade bland annat hög feber, slöhet, rosslande andning och hälta. Ett utmärkande drag var att sjukdomen hade ett mycket snabbt förlopp. I vissa fall dog djuret snabbt medan andra djur tillfrisknade efter behandling. Totalt drabbades ett tiotal djur i januari 2020 varav ungefär en tredjedel dog. Dessutom förekom fler sjukdoms- och dödsfall under våren 2020. Betesfeber misstänktes tidigt som orsak till problemen men analys av blodprov kunde endast bekräfta denna diagnos i några fall. Det faktum att djur som behandlades tidigt i sjukdomsförloppet med tetracyklin (rekommenderas som behandling av betesfeber) oftast tillfrisknade snabbt var dock en indikation på att det rörde sig om en bakteriell infektion. På grund av att det i flera fall var svårt att ställa diagnos gjorde Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) en fördjupad analys inklusive sekvensering av blodprov från ett djur med typiska symtom varpå bakterien *Mycoplasma haemobos* kunde identifieras. Denna bakterie har identifierats i samband med liknande sjukdomsutbrott i till exempel Storbritannien, men enligt studier från Tyskland kan även friska djur ha DNA från denna bakterie i blodet varför det är svårt att veta om fyndet har betydelse för detta sjukdomsutbrott.

Eftersom sjukdomsutbrottet inte var helt typiskt för betesfeber och att det i flera fall inte var möjligt att identifiera det infektionsämne som orsakar betesfeber trots symtom var det intressant att undersöka om det fanns andra infektionsämnen som separat eller i kombination skulle kunna förklara sjukdomsbilden. När vi inte vet exakt vilka infektionsämnen vi letar efter kan det vara lämpligt att undersöka prover för förekomst av så många infektionsagens som möjligt genom att använda så kallad metagenomisk analys. Hittills har få sådana undersökningar gjorts på nötkreatur i landet och därför är det viktigt att undersöka prov från både sjuka och friska djur, då tidigare studier till exempel hittat DNA från *M. haemobos* även i prov från friska djur.

För att få mer information om förekomsten av möjliga fästingburna infektioner i området är det också intressant att undersöka fästingar som samlas in från nötkreatur och/eller miljön. Sådana studier har främst gjorts i mellersta och norra Sverige med koppling till fästingburna infektioner hos människa.

För att minska risken för fästingburna infektioner bör betesmarker där fästingar trivs undvikas, men i vissa områden med många fästingar samt närvaro av vilda djur kan detta vara svårt eller till och med omöjligt. För att minska förekomsten av fästingar kan man i dessa fall använda profylax mot fästingar genom att djuren behandlas med medel mot fästingar. Sådan behandling sker enklast genom så kallade pour-on preparat vilka administreras genom att medlet hålls längs ryggen på djuret. I dagsläget finns ett preparat innehållande flumetrin registrerat i Sverige för användning till nötkreatur för detta ändamål. Enligt uppgift kan man dock inte räkna med att effekten mot fästingarna varar mer än cirka 4 veckor. Rekommendationen är därför att ombehandla djuren med jämna mellanrum under fästingsäsongen vilket kan vara praktiskt svårt att genomföra. Fästingprofylax kan även innebära vissa risker eftersom den kan leda till försvagad immunitet mot *B. divergens* vilket kan medföra ökade problem med sommarsjuka/babesios.

SYFTEN

Syftet med projektet var att i) genomföra en pilotstudie för att undersöka förekomst av infektionsämnen i fästingar och blodprov från utegående nötkreatur som drabbats av allvarliga sjukdomsproblem sannolikt orsakade av fästingburna infektioner och ii) undersöka om fästingprofylax kan minska risken för sjukdomsproblem bland betande ungdjur. På lång sikt var syftet att minska risken för fästingburna infektioner bland betande nötkreatur.

MATERIAL OCH METODER

Projektet genomfördes som en pilotstudie i den besättning som beskrivs i introduktionen.

Förekomst av infektionsämnen i blodprov från nötkreatur

För denna delstudie ingick blodprov insamlade från djur som drabbats av klinisk sjukdom (oftast feber och hänta samt i vissa fall påverkan på andningen) under april 2020 eller under sommar/tidig höst 2020 samt blodprov tagna under samma perioder från friska individer.

Blodprov med tillsats av EDTA och serum från 21 sjuka och 10 friska kontrolldjur undersöktes med metagenomisk analysmetodik (se nedan) på SVA. Eftersom den metagenomiska analysen gav osäkra resultat för *Anaplasma* spp undersöktes samma blodprov avseende förekomst av DNA från *Anaplasma phagocytophilum* med hjälp av PCR. Resultaten sammanställdes deskriptivt.

Extraktion av DNA och RNA

DNA extraherades från EDTA-blod med ZymoBIOMICS DNA Microprep Kit (Zymo Research) enligt tillverkarens protokoll. Därefter renades DNA i olika steg och eluerades i DNase/RNase-fritt vatten. RNA extraherades från serum med hjälp av TRI Reagent (Sigma-Aldrich), renades med Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research) och eluerades i DNase/RNase-fritt vatten. Extraherat RNA omvandlades till dubbelsträngat komplementärt DNA (ds-cDNA) med SuperScript® IV First-Strand Synthesis System (ThermoFisher) och Klenow Fragment (New England BioLabs).

Metagenomisk sekvensering

Koncentrationen av DNA och ds-cDNA mättes med Qubit dsDNA HS Kit (ThermoFisher) och alla prov spädde i Tris-HCl, pH 8,5 för att användas till bibliotekpreparation med Nextera XT Library Prep Kit (Illumina). DNA från sjuka djur preparerades individuellt medan DNA från friska djur poolades två och två. Fragmentering av DNA och tillverkning av bibliotek med dubbla index för varje prov inklusive rening med AMPure XP beads (Beckman Coulter) utfördes enligt tillverkarens protokoll och analyserades med High Sensitivity DNA Chip i ett Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent). Biblioteken spädde och

poolades för att efter denaturering med NaOH och ytterligare spädning sekvenseras med MiSeq 600 Cycles Reagent Kit (Illumina) i ett MiSeq instrument.

Totalt sekvenserades 26 DNA-prover varav fem innehöll pooler från två friska djur vardera och 21 prover kom från ett sjukt djur vardera. Dessutom sekvenserades ds-cDNA från 5 av de sjuka djuren. I genomsnitt kvarstod 2 637 634 sekvensbestämningar (upp till 300 nt) per prov efter kvalitetskontroll. Dessa sekvenser klassificerades taxonomiskt med accelererad BLASTx med hjälp av mjukvaran DIAMOND version 2.07 så att GenBanks® taxonomiskt id associerades med varje sekvensavläsning med hjälp av GenBank databaserna nr, prot.accession2taxid, names.dmp och nodes.dmp. Ett python-skript räknade sedan alla identiska taxid och tabulerade dessa antal med det vetenskapliga taxonomiska namn som var associerat med varje taxonomiskt id.

Analys av *A. phagocytophilum* med PCR

Extraherat DNA användes för att detektera *A. phagocytophilum* med en Realtids-PCR riktad mot citratsyntasgenen (gltA).

Kan fästingprofylax minska risken för sjukdomsproblem bland betande ungdjur?

För bedömning av förekomst av immunitet mot betesfeber samlades blodprov in i maj 2020 från 84 ungdjur som avvandes under maj månad. Hälften (n=42) av dessa djur behandlades med fästingprofylax (flumetrin 1 % pour-on, 1 ml/10 kg kroppsvikt) medan hälften (n=42) förblev obehandlade. Djuren gick sedan tillsammans i samma grupp under sommar/tidig höst. Klinisk sjuklighet noterades under perioden. I september gjordes en ny vägning av djuren och i samband med den vägningen togs nya blodprov. Fästingar samlades in från djuren vid båda provtagningarna.

Serum från 84 blodprov tagna från ungdjuren vid undersökningstillfället i maj undersöktes för antikroppar mot *A. phagocytophilum* på SVA. Eftersom antikroppar påvisades i alla prover från detta provtagningstillfälle undersöktes inte proverna från septemberprovtagningen avseende dessa antikroppar. Vi beslutade istället att undersöka serum från båda provtagningarna från ett urval av ungdjuren (n=44 prov från 22 ungdjur; 11 djur/grupp) för antikroppar mot *B. divergens* på SVA.

Resultaten sammanställdes deskriptivt. Skillnader i sjuklighet, dödlighet, tillväxt, fästingförekomst (september) och rektaltemperatur (september) mellan djur som behandlats med fästingprofylax eller inte i samband med avvänjning i maj månad undersöktes med Chi²-test eller Fisher's exact test.

Förekomst av infektiösa ämnen i fästingar från utegående nötkreatur

I samband med blodprovstagning (maj och september) från de djur som ingick i delstudien om fästingprofylax 2020 (se ovan) samlades fästingar in från djuren. Fästingarna frystes och skickades frysta till SVA för artbestämning (okulär bedömning) och andra undersökningar.

Molekylärbiologisk undersökning av fästingar

Inledningsvis extraherades DNA från ett urval av fästingarna från de två provtagningstillfällena med avsikten att undersöka förekomst av infektiösa ämnen med metagenomisk analys på samma sätt som med blodproverna. Tyvärr uppstod metodproblem varför dessa analyser inte gick att genomföra. Istället gjordes ett nytt urval av fästingar från de båda insamlingarna. Innan extraktion tvättades fästingarna i saltlösning (PBS 10 %) varpå de fick torka. Fästingarna fördes sedan över till provrör och skars sönder. Därefter extraherades DNA enligt kit-tillverkarens protokoll (DNA blood & Tissue kits, Qiagen) varpå förekomsten av 16S rRNA-genen för *Anaplasma* spp. undersöktes med NGS (new generation sequencing) på MiSeq från Illumina. Resultaten sammanställdes deskriptivt.

Undersökning av prov från vilda djur

I litteraturen finns information om att vilda djur, till exempel rådjur och hjortar, kan vara bärare av *A. phagocytophilum*. I området där besättningen finns har antalet kronhjortar ökat kraftigt på senare år. Under höstens/senvinterns jaktsäsong 2020 blev det möjligt att få tillgång till material (mjältar) från vilda djur (kronhjort, dovhjort, rådjur och vildsvin) från jägare i trakten. Om djuren hade fästingar på kroppen lades dessa i separata provrör. Mjältar och fästingar frystes så snart som möjligt och transporterades frysta till SVA. Ett urval (15 kronhjort, 11 dovhjort, 4 rådjur, 10 vildsvin) av dessa mjältar tinades, och prov togs för DNA-extraktion och undersökning avseende förekomst av *A. phagocytophilum* med hjälp av samma PCR som för blodprov (se ovan). DNA extraherades också från ett urval av fästingarna för undersökning av förekomst av 16S rRNA-genen för *Anaplasma* med NGS på MiSeq från Illumina. Resultaten sammanställdes deskriptivt.

Jämförelse av *A. phagocytophilum* från nötkreatur och hjort

DNA-extrakt från prov (blodprov från nötkreatur, mjältar från vilda djur) som var positiva med PCR skickades till Dr Sprong vid National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, Nederländerna för att utreda om samma genotyp av *A. phagocytophilum* finns hos både nötkreatur och vilda djur. För denna undersökning användes en metod utarbetad av laboratoriet i Bilthoven. I korthet undersöktes proverna med så kallad qPCR (ekotypning) följt av Sanger-sekvensering av ett fragment från GroEL-regionen. Resultaten sammanställdes deskriptivt.

RESULTAT

Förekomst av infektionsämnen i blodprov från nötkreatur

Metagenomisk undersökning

DNA från ett stort antal bakteriearter identifierades med hjälp av den metagenomiska undersökningen. Det mest intressanta fyndet (baserat på skillnader mellan sjuka och friska individer) var dock förekomst av en mykoplasma-art nära besläktad med *Mycoplasma wenyonii*. Två av proverna från sjuka djur innehöll en stor mängd sekvenser från mykoplasma, 150 392 respektive 315 435 sekvenser, och av dessa var majoriteten mest lika *M. wenyonii*. På grund av det stora antalet sekvenser i dessa prover måste gränsen för att ett annat prov ska betraktas som positivt sättas högt eftersom Illumina-instrumentet har ett visst, mycket lågt men existerande, läckage av sekvenser mellan prover som samtidigt sekvenseras på ett flödeschip. Med denna gräns satt till 100 sekvenser var prover från ytterligare 5 djur positiva för mykoplasma med antalet sekvenser i intervallet 113 till 38 655. Ingen av poolerna från friska djur var positiv för mykoplasma med detta gränsvärde. Således hade 7 av 21 prover (33 %) från sjuka djur och 0 av 10 (0 %) friska djur (poolerna bestod av pooler från 2 djur vardera) förekomst av en *M. wenyonii*-liknande mykoplasma i blodet.

Sekvensbearbetning av de två starkt positiva proverna gav närmare 75 % av genomen. Genom att analysera polC-genen framgick det att vardera prov innehöll en distinkt stam. De två stammarna var 99,12 % identiska på DNA-nivå och 99,52 % identiska på aminosyra-nivå i denna gen. Som jämförelse var likheten mellan dessa två stammar och *M. wenyonii* stam Massachusetts 75,72 % respektive 75,81 % på DNA-nivå. När en jämförelse istället gjordes av den gen som kodar för 16S-RNA i de två stammarna med tidigare rapporterade stammar i GenBank återfanns en mykoplasma-stam isolerad i Mexiko som i denna gen endast skiljde sig med en nukleotid av 1480 stycken medan *M. wenyonii* stam Massachusetts skiljde sig på 40 positioner i denna gen.

Ett annat fynd av intresse var att en stor mängd sekvenser (38 655 sekvenser) av bovint parvovirus 3 påvisades hos ett sjukt djur vilket gjorde att i stort sett hela genomet kunde bestämmas. Ett litet antal sekvenser av detta virus förekom också i proverna från fem andra sjuka djur men inte i proverna från friska djur.

Analys av *A. phagocytophilum*

PCR-metoden visade att *A. phagocytophilum*-DNA återfanns i 1 av 9 blodprov från sjuka djur och i 1 av 4 friska djur provtagna i april 2020 samt i 6 av 12 prov från sjuka djur och i 3 av 6 prov från friska djur provtagna i juni-juli (ett prov i september). Detta innebär att prover från 33 % av de sjuka djuren och 40 % av kontrolldjuren innehöll bakterie-DNA från *A. phagocytophilum*.

Saminfektioner

Nio kliniskt sjuka nötkreatur provtogs under april 2020 och av dessa hade 4 djur (ID 8131, 8180, 8458, 8249) förekomst av mykoplasma i blodet. Ett av dessa djur (ID 8180) var även positivt för *A. phagocytophilum* medan övriga var negativa för *A. phagocytophilum*. Bland de 12 djur som provtogs i juli månad var 3 (ID 9206, 9231, 9473) positiva för mykoplasma. Av dessa var 2 (ID 9206, 9473) även positiva för *A. phagocytophilum*. Båda djuren med mycket höga antal mykoplasma-sekvenser (ID 9206, 9473) provtogs i juli månad. Det djur (ID 9289) som var infekterat med bovint parvovirus 3 enligt blodprov taget i september 2020 var negativt för både *A. phagocytophilum* och mykoplasma. Ett djur (ID 8458) med få sekvenser av bovint parvovirus 3 hade även en liten mängd sekvenser av mykoplasma i blodet.

Kan fästingprofylax minska risken för sjukdomsproblem bland betande ungdjur?

Totalt undersöktes serum tagna i maj 2020 från 84 ungdjur (42 obehandlade och 42 behandlade) och alla hade antikroppar mot *A. phagocytophilum*. Undersökningen av antikroppar mot *B. divergens* i två blodprov per djur (maj och september) från 22 ungdjur (11 djur/behandlingsgrupp) visade att inget djur (0 %) var positivt vid provtagningen i maj månad medan 3 djur (14 %) var positiva (låg koncentration) vid provtagningen i september. De djur som var positiva tillhörde den behandlade gruppen. Skillnaden mellan grupper var inte statistiskt signifikant ($p = 0,21$).

Inga statistiskt signifikanta skillnader sågs mellan behandlade och obehandlade ungdjur i sjuklighet (andel av alla djur 7,1%; $p = 0,18$), dödlighet (inga dödsfall), tillväxt maj-september (medel (SD) alla djur +128 (16) kg; $p = 0,97$), fästingförekomst i september (andel av alla djur 70 %; $p = 0,47$) och rektaltemperatur (medel (SD) alla djur 39,3 (0,43) °C; $p = 0,24$).

Förekomst av infektiösa ämnen i fästingar från nötkreatur

Totalt samlades över 200 fästingar in vid olika provtagningstillfällen och alla identifierades som *I. ricinus*. Endast vuxna fästingar av honkön analyserades. Undersökningen av ett urval av 32 fästingar från maj och 32 fästingar från september visar preliminära resultat på förekomst av *A. phagocytophilum* i 2 (6 %) respektive 3 (9 %) fästingar. Analys av förekomst av den nya *M. wenyonii*-liknande stammen i fästingar planeras.

Undersökning av prov från vilda djur

Undersökningen av mjältar från vilda djur visade att 13 av 15 (87 %) kronhjortar, 7 av 11 (64 %) dovhjortar, 1 av 4 (25 %) rådjur och 0 av 10 (0 %) vildsvin hade DNA från *A. phagocytophilum* i mjältproverna.

Totalt samlades över 50 fästingar in från 8 dovhjortar, 13 kronhjortar och 2 rådjur. Alla identifierades som *I. ricinus*. Undersökningen av fästingar (vuxna, honkön) påvisade förekomst av *A. phagocytophilum* i fästingar från 6 (19 %) av djuren (1 dovhjort, 4 kronhjort och 1 rådjur). Alla dessa djur utom ett (rådjur) var positiva för *A. phagocytophilum* i mjältproverna.

Jämförelse av *A. phagocytophilum* från nötkreatur och hjort

Genotypningen av isolat av *A. phagocytophilum* från nötkreatur och hjortar visade att alla isolaten tillhörde "ecotype 1". Sekvensering av groEL-genen visade dock att alla isolat från nötkreatur utom ett var av en groEL-typ medan alla isolat från hjort utom ett var av en annan groEL-typ. Liknande jämförelser mellan stammar från nötkreatur och hjortar och stammar från fästingar planeras.

DISKUSSION

Förekomst av infektionsämnen i blodprov och fästingar från utgående nötkreatur

Det mest intressanta fyndet i blodproverna från nötkreatur med klinisk sjukdom där fästingburen infektion misstänktes var fyndet av en *M. wenyonii*-liknande art som oss veterligen inte identifierats tidigare i Sverige. Väsentlig förekomst av denna art återfanns endast hos kliniskt sjuka djur och inte bland friska kontroldjur vilket stärker misstanken att denna mykoplasma-art kan ha haft klinisk betydelse. Undersökningarna av två av isolaten tyder också på att det inte är exakt samma bakteriestam som spridit sig genom besättningen. Troligen finns det en reservoar-värd där mykoplasman cirkulerat under lång tid och hunnit divergera och därifrån sedan smittat besättningen flera gånger med olika stammar. Den stora skillnaden i sekvensen för *polC* jämfört med *M. wenyonii* stam Massachusetts, som är den mykoplasma som är mest lik den sekvenserade i detta projekt, visar att denna mykoplasma kan vara en art distinkt från *M. wenyonii*. Likheten med en mexikansk stam tyder på att den mykoplasma-art som identifierats i detta projekt kan representera en ny inte tidigare karakteriserad art, men som tycks ha global spridning.

M. wenyonii är en så kallad hemoplasma som infekterar erythrocyter (röda blodkroppar) hos nötkreatur. Bakterien har associerats med sjukdomssymtom som anemi, ödem, feber, minskad mjölkproduktion, ledsvullnad med mera i bland annat Europa och USA. Dess kliniska betydelse har dock ifrågasatts eftersom bakterie-DNA har detekterats även i blod från nötkreatur som är kliniskt friska. Det finns också indikationer på att en annan hemoplasma, *M. haemobos*, kan orsaka sjuklighet hos nötkreatur men även denna bakterie har detekterats hos friska nötkreatur. Som skrivet i inledningen identifierades *M. haemobos* från ett allvarligt sjukt djur i besättningen i början av 2020. Denna mykoplasma-art återfanns dock inte vid den metagenomiska undersökningen av de prover som ingick i detta projekt. Det är oklart vilka vektorer eller riskfaktorer som kan komma i fråga för hemoplasma-infektioner men insekter som kan överföra blod har föreslagits som en möjlig vektor.

Symtomen som beskrivits i samband med hemoplasma-infektion liknar till viss del de som ses vid infektion med *A. phagocytophilum*. Vissa studier tyder dessutom på att man hittat samtidig infektion med någon av dessa mykoplasma-arter och *A. phagocytophilum*. I besättningen som ingick i detta projekt var huvudmisstanken att sjukdomsfallen i besättningen orsakades av infektion med *A. phagocytophilum* men att andra infektionsämnen kan ha bidragit till sjukdomsproblemen som var allvarligare än förväntat vid *A. phagocytophilum*-infektion. Undersökningen av blodproverna visade också att *A. phagocytophilum* var vanligt förekommande i besättningen men andelen djur som var positiva för DNA var ungefär lika stor (ca en tredjedel) bland de friska kontroldjuren som bland de kliniskt sjuka djuren. *A. phagocytophilum* infekterar neutrofilerna vilket kan leda till försämrat immunförsvar under längre tid och risk för persistent infektion och/eller infektion med andra infektionsämnen. Alla infekterade djur blir inte kliniskt sjuka och en del djur får så milda symtom att de är lätta att missa. Eftersom mängden bakterier i blodet varierar över tid under persistent infektion kan blodprov därför vara falskt negativa. Det faktum att alla ungdjuren hade antikroppar mot *A. phagocytophilum* i maj månad är ytterligare ett bevis på att infektionen var mycket vanlig i besättningen.

Ett annat infektionsagens som vi hittade i några prover från nötkreatur med klinisk sjukdom var bovint parvovirus 3. Detta virus kan vara ett bifynd eftersom tidigare studier påvisat virus i både friska och sjuka djur. Vissa källor anger att detta virus kan ha samband med diarré, reproduktionsstörningar och respirationssjukdomar medan andra anger att detta virus troligen inte har någon större betydelse. Det är dock möjligt att latent infekterade djur kan få en reaktiverad infektion med viremi och förvärrade symptom om andra infektioner gjort djuren immunologiskt försvagade. Men eftersom en större mängd av detta virus endast påvisades i prov från ett nötkreatur som blev sjukt i september bedöms detta virus troligen inte ha någon betydelse för sjukdomsproblemen i besättningen.

Det var tyvärr inte möjligt att undersöka fästingarna insamlade från nötkreaturen med samma metagenomiska analys som gjordes av blodproverna. En sådan analys hade varit intressant för att se vilka infektionsämnen som kan finnas i fästingar i området. Det var inte möjligt att inom ramen för detta projekt identifiera orsakerna till metodproblemen. Som förväntat identifierades *A. phagocytophilum* i cirka 7,5 % av fästingarna. Det är högst sannolikt att fästingarna innehöll samma typ av bakterien som den som återfanns i blodproverna från nötkreaturen men ytterligare undersökningar krävs för att bevisa detta. Vår avsikt är att skicka DNA till Nederländerna för att kontrollera detta. Vi har också för avsikt att undersöka fästingarna avseende förekomst av den *M. wenyonii*-liknande art som identifierats hos sjuka nötkreatur.

Kan fästingprofylax minska risken för sjukdomsproblem bland betande ungdjur?

Resultaten visade att det inte fanns några signifikanta skillnader i de parametrar som undersöktes (tillväxt, klinisk sjuklighet, dödlighet, rektaltemperatur i september, förekomst av fästingar) mellan ungdjursgruppen som inte behandlades och den grupp som behandlades en gång med fästingmedel i maj månad. En möjlig anledning till det var att blodprovsanalyserna visade att alla djuren redan hade genomgått infektion med *A. phagocytophilum* vid provtagningen i maj månad eftersom de då hade antikroppar mot bakterien. Detta tyder i sin tur på att *A. phagocytophilum* var vanligt förekommande i fästingar på de marker där djuren rört sig före maj månad. Att det fanns gott om fästingar i området under våren var tydligt genom att djuren hade många fästingar på kroppen vid undersökningen i maj.

Resultaten från blodprovsanalyserna tyder även på att ett fåtal av djuren infekterades med *Babesia divergens* under sommarsäsongen. Detta infektionsagens är också fästingburet men leder sällan till klinisk sjukdom hos djur yngre än 9 till 12 månader. I augusti 2020 konstaterades dock klinisk babesios hos en ko i besättningen. Enligt uppgift hade besättningen inte tidigare haft några fall av babesios. Resultaten tyder därför på att infektionsämnet finns hos en liten andel av fästingarna i området.

Eftersom djuren redan hade varit exponerade för *A. phagocytophilum* innan behandlingen mot fästingar i maj går det inte att bedöma effekten av utförd fästingprofylax på spridning av detta infektionsämne i besättningen. Förekomsten av fästingar och andra undersökta parametrar skiljde dock inte mellan den behandlade och den obehandlade gruppen. I besättningen som ingick i studien var det endast praktiskt möjligt att genomföra en profylaktisk behandling mot fästingar. Enligt FASS vet man i fästingtäta områden behandla två gånger med tre veckors mellanrum på våren följt av en engångsbehandling på hösten. Det är dock inte troligt att en sådan behandling skulle ha lett till ett bättre resultat i besättningen som ingick i projektet eftersom djuren blev infekterade tidigare under året.

Betydelsen av vilda djur för spridning av *A. phagocytophilum* bland nötkreatur

Resultaten visade att anaplasmos är vanligt bland hjortar i området eftersom en stor andel av kron- och dovhjortarna var positiva för *A. phagocytophilum*. Detta stämmer väl med tidigare undersökningar i andra delar av Sverige. Enligt uppgift verkar hjortarna inte få någon allvarlig sjukdomspåverkan av infektionen.

För att undersöka om vilda hjortdjur kan vara en smittkälla för nötkreaturen i området ville vi undersöka om samma typer av *A. phagocytophilum* återfanns hos båda grupperna. Genotypningen av isolat av *A. phagocytophilum* från nötkreatur och hjortar visade att alla isolaten som väntat tillhörde den så kallade "ecotype 1" men sekvenseringen av groEL-genen visade att isolaten från nötkreatur i huvudsak tillhörde en annan genotyp än isolaten från vilda hjortdjur. Detta tyder därför på att en genotyp cirkulerar bland nötkreaturen och en annan bland hjortarna och att hjortarna inte är en drivande faktor för spridning av *A. phagocytophilum* bland nötkreaturen.

Det är sannolikt att de isolat av *A. phagocytophilum* som identifierades i fästingar från vilda hjortdjur är av samma genotyp som den som återfanns i mjältprover från dessa djur men detta bör undersökas varför vår avsikt är att skicka DNA till Nederländerna för undersökning på samma sätt som beskrivits ovan.

SAMMANFATTANDE KONKLUSIONER

Denna pilotstudie visade på förekomst av nya infektionsämnen, *M. wenyonii*-liknande art och bovint parvovirus 3, i blodprov från utegående nötkreatur som drabbats av sjukdom som misstänktes vara orsakad av fästingburna infektioner. Det kan inte uteslutas att dessa infektionsämnen kan ha haft betydelse för klinisk sjukdom. Vi fann också att infektion med *A. phagocytophilum* var vanligt förekommande i besättningen. Det är möjligt att sådan infektion kan ha lett till hämning av immunförsvaret vilket gjort djuren extra känsliga för andra infektioner och i sin tur lett till ökad sjuklighet. Saminfektioner har troligen betydelse för sjukdomsförloppet eftersom sådana kan leda till allvarigare sjukdom än enkelinfektioner. Vi fann också att vilda hjortar i området inte är en viktig smittkälla för infektion med *A. phagocytophilum* bland nötkreaturen.

Att fästingar är en vektor för infektion med *A. phagocytophilum* konfirmerades genom fynd av DNA från denna bakterie i fästingar insamlade från nötkreatur. Fästingprofylax brukar ingå som en rekommendation för att komma till rätta med sådana infektioner. I den djurgrupp som studerades i detta projekt hade fästingprofylax vid ett tillfälle i maj månad dock ingen påverkan på undersökta variabler som tillväxt och sjuklighet. Det faktum att alla ungdjuren hade antikroppar mot *A. phagocytophilum* redan innan behandling kan dock ha påverkat resultatet.

För att ytterligare undersöka betydelsen av den *M. wenyonii*-liknande art som detekterades är avsikten att på sikt ta fram ett PCR-test specifikt för denna art som kan användas för att undersöka ett större antal prover för den här arten. Vi hoppas också kunna undersöka förekomst av denna art i insamlade fästingar.

Introduktion av nya infektionsämnen via fästingar kan leda till nya sjukdomar och/eller att redan kända infektionssjukdomar förvärras. Ökad sjuklighet och dödsfall är kostsamt för näringen. Genom att öka kunskapen om detta område kan behov av förebyggande åtgärder samt åtgärder för att tidigt hitta och eventuellt behandla drabbade djur identifieras.

RESULTATFÖRMEDLING

- Resultaten redovisas i slutrapport till Svenska Köttföretagen. Vi planerar även att informera om studien genom populärvetenskapliga artiklar i lämpliga tidskrifter. Vi hoppas också kunna presentera resultaten vid nationella seminarier/möten samt i form av en vetenskaplig publikation.

PROJEKTGRUPP

- Karin Persson Waller, Avdelningen för djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA (huvudsökande)
- Håkan Andersson, Avdelningen för mikrobiologi
- Kerstin Dahlgren, KC Ranch
- Giulio Grandi, Avdelningen för mikrobiologi, SVA
- Mikael Leijon, Avdelningen för mikrobiologi, SVA
- Anna Omazic, Avdelningen för kemi, miljö och fodersäkerhet, SVA

REFERENSER (ETT URVAL)

Ayling RD et al. 2012. Detection of 'Candidatus Mycoplasma haemobos', *Mycoplasma wenyonii* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle in England. *Veterinary Record*, doi: 10.1136/vr.100636.

Brown WC, Barbet AF. 2016. Persistent infections and immunity in ruminants to arthropod-borne bacteria in the family Anaplasmataceae. *Annu Rev Anim Biosci* 4, 177-197.

Buchfink B et al. 2021. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods* 18, 366-368.

Henningsson BM et al. 2015. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes Ricinus* ticks from Norway using a realtime PCR assay targeting the anaplasma citrate synthase gene *gltA*. *BMC Microbiology*, 15, 153.

- Jaarsma RI et al. 2019. Anaplasma phagocytophilum evolves in geographical and biotic niches of vertebrates and ticks. Parasites Vectors, 12, 328.
- Niethammer FM et al 2018. Hemotrophic mycoplasma in Simmental cattle in Bavaria: prevalence, blood parameters, and transplacental transmission of 'Candidatus Mycoplasma haemobos' and Mycoplasma wenyonii. Acta Vet Scand, 60, 74.
- Nouvel LX et al. 2019. First detection of Mycoplasma wenyonii in France: Identification, evaluation of the clinical impact and development of a new specific detection assay. Comp Immun Microbiol Inf Dis, 63, 148-153.
- Rar V et al. 2021. Genetic diversity of Anaplasma bacteria: Twenty years later. Infection, Genetics and Evolution, 91, 104833.
- Razanske I et al. 2019. Prevalence and co-infection with tick-borne Anaplasma phagocytophilum and Babesia spp. in red deer (Cervus elaphus) and roe deer (Capreolus capreolus) in southern Norway. IJP: Parasites Wildlife 8, 127-134.
- Silaghi C et al. 2018. Epidemiology, genetic variants and clinical course of natural infections with Anaplasma phagocytophilum in a dairy cattle herd. Parasites & Vectors, 11, 20.
- Strugnell B, McAuliffe L. 2012. Mycoplasma wenyonii infection in cattle. In Practice 34, 146-154.
- Stuen S et al. 2013. Anaplasma phagocytophilum – a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Cellular and Infection Microbiology, 3, 31.

EKONOMISK RAPPORT

Kostnader inom projektet som söks från Svenska Köttföretagen

Provtagning och transporter av prov från nötkreatur	= 23 133
Metagenomisk undersökning av blodprov från nötkreatur	= 85 250
Undersökning av infektionsämnen i fästingar från nötkreatur	= 40 534
Analys av antikroppar och utstryk i blodprov från nötkreatur	= 53 120
OH (SVA 40 %):	= 80 815
Total kostnad	= 282 852

Övriga projektkostnader

- Projektledning och resultatbearbetning på SVA.
- Urval av djur, provhantering och sammanställning av djurdata på gård.
- Medel för fästingprofylax på gård.
- Provtagning och undersökning av prov från vilda djur.