

Tilraunabólusetning gegn kregðu 2016

Prófun bóluefnis og mat á lungum sláturlamba

Charlotta Oddsdóttir¹, Einar Jörundsson²,
Eggert Gunnarsson², Ólöf G. Sigurðardóttir²,
Vala Friðriksdóttir² og Vilhjálmur Svansson²

¹Landbúnaðarháskóla Íslands

²Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum



Rannsóknina og skýrsluna unnu:

Einar Jörundsson (EJ), Eggert Gunnarsson (EG), Ólöf G. Sigurðardóttir (ÓGS), Vala Friðriksdóttir (VF) og Vilhjálmur Svansson (VS), Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum, og Charlotta Oddsdóttir (CO), Landbúnaðarháskóla Íslands

í samstarfi við:

Björn Steinbjörnsson (BS), sjálfstætt starfandi dýralækni

Sigrúnu Bjarnadóttur (SB), Matvælastofnun

Helgu B. Ingimarsdóttur og Vigni Á Sveinsson, ábúendur á Höfnum á Skaga

Efnisyfirlit

Inngangur/forsaga.....	2
Um kregðu.....	2
Bóluefni.....	2
Tilraunaáætlun.....	3
Framkvæmd tilraunar.....	4
Niðurstöður.....	7
Tölfræði.....	9
Samantekt.....	10
Tilvitnanir.....	11
Viðaukar.....	12

Inngangur/forsaga

Skýrsluhöfundar (ÓGS, EJ, EG, VS, CO, VF) fengu það verkefni að endurskrifa umsókn fyrir tilraunabólusetningu gegn kregðu í sauðfé þann 6. apríl 2016. Fyrri umsókn, skrifaðri af Birni Steinbjörnssyni, hafði verið hafnað af Fagráði um velferð dýra 1. apríl. Ný umsókn var send Fagráðinu 22. apríl og var samþykkt þann 27. apríl. 2016.

Skýrsluhöfundar sáu um framkvæmd verkefnisins í samvinnu við ábúendur á Höfnum á Skaga, Helgu B. Ingimarsdóttur og Vigni Á Sveinsson, sem og Björn Steinbjörnsson (BS).

Áður en að því kom hafði BS látið framleiða bóluefni gegn kregðu sem notað var í tilrauninni.

Um kregðu

Kregða er sjúkdómur í sauðfé af völdum *Mycoplasma ovipneumoniae* (*M. ovipneumoniae*) (Sheehan M *et al.*, 2007; Friss NF *et al.*, 1976). Þó kregða sé þekkt í sauðfé hérlendis og erlendis er ýmislegt í meingerð sjúkdómsins sem er óþekkt. Meðal annars er ekki vitað hvort bakterían er innanfrumu- eða utanfrumusýkill. Eins er ekki vitað hvort mótefnasvörun eða frumubundið ónæmissvar sé aðal varnarþáttur gegn sjúkdómnum, eða hvort báðir þættir séu nauðsynlegir.

Sjúkdómurinn hefur verið þekktur í áratugi á Norðausturlandi en hefur á seinni árum náð fótfestu víða um land (Friss NF *et al.*, 1976; Þórarinsdóttir GE, 2014). Í rannsókn Guðríðar Þórarinsdóttur árið 2014 á algengi og útbreiðslu sjúkdómsins í sláturlömbum frá Suðvestur-, Suður- og Suðausturlandi kom í ljós að kregða fannst á öllum þessum svæðum (í 10 varnarhólfum). Sjúkdómurinn fannst í 60% af 232 búum. Tíðni kregðu á þessum bæjum var ekki há, hún fannst eingöngu í 4% af þeim 24.772 lungum sem skoðuð voru. Það var hins vegar nokkur breytileiki í tíðni sjúkdómsins á milli bæja, var frá 0-21.4%. Einnig var breytileiki á milli varnarhólfa, frá 1.4-13.4%. Í 65% lungna með kregðu var um væga sýkingu að ræða, 25% jákvæðra lungna voru með miðlungs sýkingu, en 10% voru metin með alvarlega sýkingu (Þórarinsdóttir GE, 2014).

M. ovipneumoniae sýking herjar einkum á lömb. Hún veldur hósta og er jafnvel talin valda vanþrifum og hugsanlegum dauðsföllum á fjalli. Við haustslátrun sjást oft bólgubreytingar í framlöðum lungna. Ásetningsslömb halda áfram að hósta fram eftir vetri og virðast oft þrífast illa. Sýking dregur fé aftur á móti sjaldnast til dauða. Hins vegar er talið að *Mycoplasma* sýking veikli lungu og geri þau móttækilegri fyrir öðrum bakteríusýkingum, s.s. *Pasteurella* spp., sem þá geta fylgt í kjölfarið og jafnvel dregið dýrin til dauða.

Bóluefni

Ekkert bóluefni er fánlegt á almennum markaði gegn kregðu í sauðfé. Helstu tálmanir í þróun kregðubóluefnis er hversu erfitt er að rækta bakteríuna, auk þess sem mikill breytileiki er á milli stofna. Erlenlis eru nokkur fyrirtæki sem taka að sér framleiðslu sérsniðinna bóluefna gegn kregðu. Eitt af þeim er fyrirtækið Vaxxinova í Þýsklandi sem framleiddi sérsniðið tilraunabóluefni úr *M. ovipneumoniae* stofnum sem voru einangraðir við örverufræðideild Dýralæknaháskólans í Hannover úr hrút frá Höfnum á Skaga (Bæjarnr. 19H1b, búnr. 1458541), en kregða hefur, að sögn ábúenda, verið mikið vandamál þar undanfarin ár.

Nýlega birtist grein um bólusetningartilraun í fullorðnu sauðfé (Ziegler *et al.*, 2007) með sérsniðnu bóluefni gegn kregðu sem er mjög sambærilegt tilraunabóluefninu sem framleitt var af Vaxxinoa. Í þeirri tilraun kom í ljós að sjálf bólusetningin veldur ekki neinum stórvægilegum neikvæðum áhrifum á líðan tilraunadýranna öðrum en vægum bólgum á bólusetningarstað sem er vel þekkt þegar ónæmisglæðir er olía. Meginniðurstaða tilraunarinnar var að nokkuð stóran skammt af bakteríum þarf til að fá fram mótefnasvörun og að bólusetja þarf tvisvar sinnum. Bólusetningin kom einnig í veg fyrir að bakterían næði fótfestu („kólónisering“) í nefkoki tilraunadýranna, en ekki var kannað hvort bólusetningin veitti dýrunum vörn gegn sjúkdómnum.

Með tilliti til niðurstaðna Ziegler *et al.* var ákveðið að nota sama magn af bakteríu í tilraunabóluefninu frá Vaxxinoa. Öfugt við niðurstöður Ziegler *et al.* var ákveðið að bólusetja ærnar aðeins einu sinni þar sem skipulagning rannsóknarinnar tafðist og þar af leiðandi orðið stutt í burð. Það þótti þó líklegt að kindurnar hefðu sýkst fyrir á ævinni og var talið að með bólusetningunni væri verið að endurræsa fyrra ónæmissvar gegn kregðu.

Lömb með kregðu sýna sjúkdómseinkenni fljótlega eftir burð sem getur bent til þess að sú mótefnavörn sem þau fá með broddmjólkinni sé ekki nægjanleg í mörgum tilfellum. Af þeim sökum var valið að bólusetja lömbin snemma eftir burð (ónæmiskerfi lamba er orðið virkt þegar á seinni hluta meðgöngu) og endurbólusetja síðan (Gaylor E, 2007).

Tilraunaáætlun

Um var að ræða forkönnun (pilot project) á því hvort bólusetning gæti komið í veg fyrir kregðu í sauðfé af völdum *M. ovipneumoniae*.

Verkefninu var skipt í 3 verkþætti:

1. Prófun bóluefnis

- Fimm veturgamlar kindur á Tilraunastöðinni á Keldum sprautaðar með tilraunabóluefni til að kanna hugsanlega óæskilegar aukaverkanir.
- Fjögur lömb á Tilraunabúi Landbúnaðarháskóla Íslands að Hesti, um 5 daga gömul, sprautuð með tilraunabóluefni til að kanna óæskilegar aukaverkanir.

Bóluefni (2 ml) sprautað undir húð á snöggan blett undir vinstri olnboga. Fylgst með eftirfarandi þáttum:

- Líkamshiti mældur við bólusetningu og daglega í vikutíma
- Bólusetningarstaður skoðaður og metinn m.t.t. roða, bólgu, eymsla, hita og hugsanlega ígerðar í íkomustað
- Fylgst með almennri hegðun strax eftir bólusetningu og síðan daglega í vikutíma, sem og áti og drykkjarlyst.

2. Bólusetningartilraun - Hafnir á Skaga

a) Bólusetning að vori:

Bólusetja lambfullar ær og annan tvílembing undan óbólusettum ám.

Velja 150 ær, þar af minnst 100 tvílembdar ær (skv. ómskoðun), handahófskennt úr þremur aldurshópum (gemlingar, tvævetlur og eldri ær); svokallað „randomized block design“.

Hópur 1: 50 lambfullar ær bólusettar undir húð á hálsi einu sinni, u.þ.b. 3 vikum fyrir burð. Bólusett á hálsi til að valda sem minnstu hnjaski á lambfullum ám skömmu fyrir burð.

Blóðsýni tekin til að meta virkni bóluefnisins, 0-blóð tekið fyrir bólusetningu (dagur 0) og aftur tekið blóð u.þ.b. 4 vikum eftir bólusetningu.

Hópur 2: Annar tvílembingur (tvílembingur 1) undan 100 ám bólusettur tvisvar sinnum undir húð með u.þ.b. þriggja vikna millibili (1. viku eftir burð og aftur u.þ.b. 3 vikum seinna).

Hópur 3: Hinn tvílembingur (tvílembingur 2) óbólusettur og notaður sem viðmið við hóp 2.

Hópur 4: Viðmiðunarhópur – þ.e. öll lömb sem ekki er í hópi 1-3 (óbólusett lömb undan óbólusettum ám), til að kanna tíðni sjúkdómsins á búinu.

b) Bólusetning að hausti:

Um leið og lömb koma af fjalli.

Endurbólusetja 50 lömb sem bólusett voru að vori.

Blóðsýni tekin úr 25 lömbum úr hverjum hópi strax eftir komu af fjalli.

Einnig tekin blóðsýni úr 25 af 50 haustbólusettum lömbum, um 3-4 vikum eftir bólusetningu. Alls tekin 100 blóðsýni í mótefnaþæfingu.

3. Mat á lungum

Við slátrun á að skoða lungu úr öllum tilraunalömbum í **hópi 1, 2 og 3**, og kvarða og skrá lungnabreytingar.

Að auki verða lungu úr minnst 50 lömbum undan óbólusettum ám skoðuð til samanburðar við lömb undan bólusettum ám (**hópur 4**). Ætlað er að fara eftir matskerfi Sheehan *et al.*, (2007) á útbreiðslu bólgubreytinga; þ.e. væg (<10%), miðlungs (10-20%) og alvarleg (>20%) kregða.

Áætlað er að senda 5 lungu úr hverjum hópi (hópi 1-4), samtals 20 lungu, á Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum til áframhaldandi rannsókna. Á Keldum verða tekin sýni í sýklaræktun og vefjameinafræðirannsókn. Bólgubreytingar vegna kregðu eru nokkuð einkennandi við smásjárskoðun, en einnig er hægt að staðfesta sýkinguna með mótefnalitun (Sheehan M *et al.*, 2007).

Framkvæmd tilraunar

1. Prófun bóluefnis

a) Fullorðnar kindur; Tilraunastöðin á Keldum:

Fimm veturgamlar kindur voru bólusettar með 2 ml undir húð á snögga blettinn við vinstri olnboga. Kindurnar voru skoðaður dagleg í viku. Íkomustaður bóluefnis var skoðaður m.t.t. bólgu, roða, hita og eymsla. Líkamshiti var mældur daglega og fylgst með átlist og almennt líðan dýranna, m.a. hvort fram kæmi holti eða önnur áhrif á hreyfingu.

b) Lömb; Tilraunabúið að Hesti:

Fjögur lömb voru bólusett við vinstri olnboga (2 lömb fengu 2 ml og 2 fengu 1) og var fylgst með þeim í fjóra daga á eftir, stungustaðurinn skoðaður.

Framkvæmd: EG og CO (27. apríl og 12. maí 2016)

2. Bólusetningartilraun

a) Bólusetning að vori (sjá töflu 1):

Bólusetning var framkvæmd að mestu leyti samkvæmt rannsóknaráætlun. Fimmtíu lambfullar ær, hópur 1, voru bólusettar einu sinnu, u.þ.b. 3. vikum fyrir burð. 87 tvílembingar í hópi 2 voru tvíbólusettir með 3-4 vikna millibili, 13 fengu eina bólusetningu og 2 af tvílembingunum í hópi 3 voru bólusettir einu sinni. Í viðmiðunarhópnum, hópi 4, voru um 500 lömb.

Tafla 1. Bólusetning að vori

Hópur		Fjöldi dýra	
		Bólusetning 1	Bólusetning 2
1	Bólusettar lambfullar ær	50	0
2	Tvílembingur 1, tvíbólusettur	100	87
3	Tvílembingur 2, óbólusettur	0	(2)
4	Viðmiðunarhópur, óbólusett lömb undan óbólusettum ám	0	0

Framkvæmd: EG, VS, CO með aðstoð ábúenda á Höfnum (06. og 23. maí, 15. og 21. júní 2016).

b) Bólusetning að hausti:

Öll ásetningsslömb úr hópnum fjórum voru bólusett um haustið (munnlegar upplýsingar) - Framkvæmd: BS.

Blóðsýni voru tekin úr ám og lömbum, bæði fyrir og eftir bólusetningu (sjá töflu 2).

Af 112 blóðsýnum voru 62 úr bólusettum ám (hópur 1), þar af 12 þöruð sýni; seinna blóðsýnið var tekið 17 dögum eftir bólusetningu. 40 blóðsýni voru úr lömbum, þar af 12 þöruð sýni úr tvíbólusettum tvílembingum (hópur 2) og 10 þöruð sýni úr óbólusettum tvílembingum (hópur 3); seinna blóðsýnið úr tvílembingunum var tekið 23-29 dögum eftir að tvílembingur 1 var bólusettur í annað sinn. Einnig voru tekin 10 blóðsýni úr óbólusettum ám og 3 blóðsýni úr lömbum undan bólusettum ám. Sermið var hirt og fryst.

Tafla 2. Blóðsýni

Hópur		Fjöldi dýra	
		Dagur 0	Dagur 17-29
1	Bólusettar lambfullar ær	50	12
2	Tvílembingur 1, tvíbólusettur	11	10
3	Tvílembingur 2, óbólusettur	8	8
4	Viðmiðunarhópur, óbólusett lömb undan óbólusettum ám	3	
-	Óbólusettar ær	10	

Framkvæmd: EG, VS, CO með aðstoð ábúenda á Höfnum (06. og 23. maí, 15. og 21. júní 2016).

3. Mat á lungum

Lömbum átti upphaflega að slátra í 3 hollum en var slátrað í 4 hollum á tímabilinu 30. september til 31. október 2016.

Starfsfólk frá Keldum fór í sláturhúsið á Blönduósi þrjú fyrstu skiptin en fékk lungu send á Tilraunastöðina eftir fjórðu slátrun.

Í sláturhúsinu var öllum eyrnamerkjum safnað saman í sláturröð til að bera saman við útskriftir úr sláturhúsinu. Þegar lömbin komu á sláturlínuna fengu lungun úr þeim raðnúmer til að hægt væri að rekja til einstaklingsnúmers. Eftir að öllum lungum var safnað saman var farið með þau úr slátursal og í lítið rými þar sem hægt var að skoða þau öll og skrá breytingar. Upphaflega var notað matskerfi Sheehan *et al.*, (2007) með kvarðann 0-3 fyrir útbreiðslu kregðubreytingar, en einnig voru aðrar breytinga s.s. lungnahrún og ormasýkingar metnar og skráðar.

Öll 718 lungu, að undanskildum 13 lungum á fyrsta sláturdegi og einum lungum á síðasta sláturdegi, voru skoðuð og metin, en heildarfjöldi lungna í lokaniðurstöðum rannsóknarinnar var 694 (sjá töflu 3).

Hópur 1: 69 af 89 lömbum undan bólusettingum á voru send í slátrun og öll lungu skoðuð.

Hópur 2: Af 100 bólusettingum tvílembingum voru 78 sendir í slátrun og allir utan þriggja skoðaðir. Tíu af þessum lömbum höfðu einungis verið bólusett einu sinni og voru þau því ekki tekin með í heildarmatinu. Heildarfjöldi lungna úr tvíbólusettum lömbum í lokaniðurstöðum var því 65.

Hópur 3: Af 100 óbólusettum tvílembingum voru 80 sendir í slátrun og öll lungun utan ein skoðuð. Einn tvílembingurinn hafði verið bólusettur einu sinni og var því ekki tekinn með í heildarmatinu. Heildarfjöldi lungna úr óbólusettum tvílembingum í lokaniðurstöðunum var því 78.

Hópur 4: Lömb í viðmiðunarhópnum sem hvorki voru bólusett né undan bólusettum ám voru 492; af þeim voru 482 skoðuð og með í lokaniðurstöðum.

Tafla 3. Fjöldi lungna sem skoðuð voru

Dagsetning	Fjöldi sláturlamba			
	Hópur 1: Lömb undan bólusettum ám	Hópur 2: Bólusettur tvílembingur	Hópur 3: Óbólusettur tvílembingur	Hópur 4: Viðmiðunar- hópur
30.09.2016	27	39	29	142
06.10.2016	20	18	33	221
12.10.2016	18	6	15	79
31.10.2016	4	2	1	40
	69	65	78	482

Í sláturhúsinu voru tekin 36 lungnasýni í vefjaskoðun og af þeim 21 í sýklaræktun. Af þeim 21 lungum sem tekin voru í sýklaræktun voru 14 einnig tekin í Mycoplasma ræktun. Flest þeirra voru með einkennandi kregðubreytingum, en einnig nokkur sem vafi var um, s.s. lungnahrún. Einstaka lungu voru með breytingar sem samrýmdust lungnapest og voru sýni úr þeim tekin í áframhaldandi rannsóknir.

Framkvæmd: EJ, ÓGS, BS, ásamt einum líffræðingi/lífeindafræðingi frá Keldum í hverri ferð; einnig með aðstoð ábúenda á Höfnum (30. 09., 06.10 og 12.10. 2016). Greining á Keldum unnin af EJ, ÓGS og öðru starfsfólki Keldna.

Niðurstöður

1. Prófun bóluafnis

- a) Kindur á Keldum: Á öðrum degi eftir bólusetningu kom fram smávægilegur þroti á bólusetningarstað en engin eymsli, roði eða hiti. Líkamshiti hélst eðlilegur. Bólusetning hafði engin áhrif á átlísta eða almenna líðan. Ekki varð heldur vart við holti.
- b) Lömb á Hesti: Fjórum dögum eftir að lömbin voru sprautuð hafði aðeins sést væg bólgva við stungustað og voru lömbin sett út eftir skoðun.

2. Bólusetningartilraun

- a) Bólusetning að vori:
Bólusetning gekk vel. Að sögn ábúenda í Höfnum virtist bólusetning ekki hafa nein áhrif á almenna líðan á nna eða lambanna. Ekki varð vart við neina holti. Við skoðun á lömbum við aðra bólusetningu þremur vikum eftir fyrstu bólusetningu sáust engin merki eftir fyrri bólusetninguna.

Hópur 1: Af bólusettum ám voru 9 einlembdar og 40 tvílembdar; heildarfjöldi lamba undan bólusettum ám var því 89.

Hópur 2: Af 100 bólusettum tvílembingum (tvílembingum 1) voru 87 tvíbólusettir og 13 eingöngu bólusettir einu sinni.

Hópur 3: Af 100 óbólusettum tvílembingum (tvílembingum 2) voru 2 bólusettir einu sinni fyrir mistök.

Blóðsýnataka

Til stendur að setja upp ELISA-próf með mótefnavakanum í bóluafninu án ónæmisglæðisins. Ekki er búið að mæla mótefni í sermi þar sem mótefnavakinn hefur ekki enn borist frá Vaxxinoa.

- b) Bólusetning að hausti:
Öll ásetningslömb úr hópunum fjórum voru bólusett um haustið (munnlegar upplýsingar). Ekki hafa borist neinar upplýsingar um aukaverkanir af haustbólusetningu.

3. Mat á lungum

Fjöldi lungna í lokamatinu var 694, þar af 69 lungu úr lömbum undan bólusettum ám (hópur 1), 65 úr tvíbólusettum tvílembingum (hópur 2) og 78 úr óbólusettum tvílembingum (hópur 3). Í hópi 4, viðmiðunarhópnum, voru lungu 482 talsins.

Eftir að búið var að gera stórsætt mat og skoða vefjasýni var ákveðið að breyta kvörðuninni (sjá töflu 4). Við fyrstu ferð í sláturhúsið kom í ljós að kregða var ekki eins mikið vandamál og búið var við samkvæmt fyrri upplýsingum. Einnig sýndi vefjaskoðun að lungu sem voru metin stórsætt sem lungnahrún (sjá mynd 1 í viðauka) voru með bólgubreytingar í berkjungum sem samrýmdust kregðu. Því fengu þessi lungu í nýja matskerfinu stig 1. Lungu sem voru með mjög litla útbreiðslu, 1-2% af lungum, fengu stig 2, lungu með væga útbreiðslu (3-9%) stig 3, miðlungs útbreiðsla (10-20%) stig 4 og útbreidd kregða (>20%) stig 5 (sjá myndir í viðauka 2).

Tafla 4. Mat á kregðubreytingum eftir útbreiðslu

	Nýtt matskerfi		Gamla matskerfið
Stig 1	Lungnahrún	?	*
Stig 2	1-2%		
Stig 3	3-9%	Stig 1	< 10%
Stig 4	10-20%	Stig 2	10-20%
Stig 5	> 20%	Stig 3	> 20%

* Óljóst hvort lungnahrún kemur undir stig 1 í þessu matskerfi

Af 69 lömbum undan bólusettingum á m (hópur 1) voru 5 með kregðubreytingar, 4 af 65 tvíbólusettingum lömbum (hópur 2), 9 af 78 óbólusettingum tvílembingum (hópur 3) og 70 af 482 lömbum í viðmiðunarhópnum (hópur 4) (sjá töflur 5 og 6).

Tafla 5. Fjöldi lungna skoðaður/ fjöldi með kregðu (%)

Dagsetning	Hópur 1: Lömb undan bólusettingum á m		Hópur 2: Bólusettingur tvílembingur		Hópur 3: Óbólusettingur tvílembingur		Hópur 4: Lömb í viðmiðunarhóp	
30.09.2016	27/2	(7,4%)	39/2	(5,1%)	29/2	(6,9%)	142/8	(5,6%)
06.10.2016	20/1	(5,0%)	18/2	(11,1%)	33/5	(15,1%)	221/36	(16,3%)
12.10.2016	18/2	(11,1%)	6/0	(0,0%)	15/2	(13,0%)	79/18	(22,0%)
31.10.2016	4/0	(0,0%)	2/0	(0,0%)	1/0	(0,0%)	40/8	(20,0%)
Heildarfjöldi	69/5	(7,2%)	65/4	(6,1%)	78/9	(11,5%)	482/70	(14,5%)

Í 95% lungna (84 lungum) með kregðu voru kregðubreytingar mjög vægar til vægar (stig 1-3). Einungis 3 lömb voru með miðlungs útbreiddar kregðubreytingar og 1 með útbreiddar kregðubreytingar. Þessi lömb voru öll í viðmiðunarhópnum (hópi 4, sjá töflu 6).

Við skoðun á lungum var áberandi að nær 100% af lömbum voru með merki um lungnaormasýkingu (myndir 1, 2, 3, 6 og 8, viðauka 2).

Tafla 6. Fjöldi lungna í hverju matsstigi kregðubreytinga eftir hópum

		Hlutfall lungna í hópum með kregðubreytingar – flokkað eftir matsstigum				
		Stig 1	Stig 2	Stig 3	Stig 4	Stig 5
Hópur 1	Lömb undan bólusettingum á m	20%	40%	40%	0%	0%
Hópur 2	Tvíbólusettingur tvílembingar	25%	25%	50%	0%	0%
Hópur 3	Óbólusettingur tvílembingar	78%	11%	11%	0%	0%
Hópur 4	Viðmiðunarhópur (óbólusettingur lömb undan óbólusettingum á m)	43%	27%	24%	4%	1%
	% allra kregðulungna	44%	26%	25%	4%	1%

Þar sem lungnasýni voru tekin áður en unnt var að bera saman raðnúmer við lambanúmer, varð skekkja í sýnatöku. Því voru ekki tekin 5 lungu úr hverjum hópi eins og rannsóknaráætlun gerði ráð fyrir.

Af 36 lungum teknum í vefjarannsókn voru tvenn lungu úr lömbum í hópi 1, þrenn úr hópi 2, þrenn úr hópi 3 og 27 úr hópi 4. Þau lungu sem tekin voru í vefjarannsókn höfðu fengið stórsætt mat frá stigi 1 og upp í 5, en langflest stig 2 og 3.

Vefjaskoðun staðfesti kregðubreytingar í 34 af 36 lungum. Í tvennum lungum sem höfðu fengið kregðustig 3, bæði hvað varðaði útlit stórsærra breytinga og staðsetningu þeirra, reyndist annað lungnasettið vera með bráðar bólgubreytingar einkennandi fyrir lungnapest og ræktaðist *Pasteurella spp.* úr því. Í hinum lungunum voru bráðar bólgubreytingar í tengslum við lungnaormasýkingu. Kregðubólgubreytingar voru svipaðar í öllum lungum, þ.e. langvinn berkjungabólga sem oftast nær teygði sig út í lungnavef, óháð stórsæju mati (sjá myndir í viðauka 2).

Af 21 lungum sem sett voru í almenna sýklaræktun, ræktaðist *Pasteurella spp.* úr 11 lungum en ekkert ræktaðist úr 10 lungum. Þrenn af 10 kregðulungum sem voru neikvæð í sýklaræktun voru einnig með lungnapestarlegar bólgubreytingar á svæðum í lungnavefnum.

Ekki var gert ráð fyrir í rannsóknaráætluninni að rækta sérstaklega fyrir *M. ovipneumoniae*, en ákveðið var að gera það til að hægt væri að bera stofna sem ræktuðust úr lungum sláturlamba saman við bóluefnisstofna. Af 12 lungum sem reynt var að rækta úr ræktaðist *Mycoplasma ovipneumoniae* úr 11 og hafa þeir stofnar verið sendir í raðgreiningu svo hægt sé að bera þá saman við upprunalega bóluefnisstofna.

Óskað hefur verið eftir að fá senda til Keldna bakteríustofnana sem notaðir voru í bóluefnið svo hægt verði að gera þennan samanburð. Einnig hefur verið óskað eftir að fá mótefnavakann frá Vaxxinoa til mótefnamælinga.

Tölfræði

Niðurstöður mats á lungum voru teknar saman í tíðnitöflu. Við úrvinnslu gagna var notað tölfræðiforritið JMP® 13.0.0. Þegar meta skal hvort tölfræðilega marktækur munur sé á hlutföllum hópa í tíðnitöflu, er hægt að nota kí-kvaðrat eða Fisher's exact próf til þess að álykta um hversu líklegar tvær breytur eru til að vera óháðar hvor annari. Fisher's exact test er harðgerðara (more robust) m.t.t. lægri væntingartíðni (expected frequency). Eins og sjá má af niðurstöðum útreikninga í töflum 7 og 8 sýnir hvorugt þessara prófa marktækan mun milli hópa, þegar miðað er við marktæktarstig (significance level) $\alpha = 0,05$. Sjá nánari útreikninga í **viðauka 3**. Við getum því ályktað að ekki sé marktækt samband milli bólusetningar og kregðubreytinga í þessari tilraun.

Tafla 7. Samband bólusetningar annars tvílembings og kregðu

		Kregða		Summa raða
		Já	Nei	
Bólusetning	Já	4	61	65
	Nei	9	69	78
	Summa dálka	13	130	143

Kí-kvaðrat og Fisher's exact próf

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided) ^a
Pearson Chi-Square	1,244	1	0,265		
Fisher's Exact Test				0,383	0,206

a. Prob(Kregða=pos) is greater for tvílembing=oboluset than boluset

Tafla 8. Samband bólusetningar ær og kregðu í lömbum

		Kregða í lömbum		Summa raða
		Já	Nei	
Bólusetning	Já	5	64	69
	Nei	70	412	482
	Summa dálka	75	476	551

Kí-kvaðrat og Fisher's exact próf

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided) ^a
Pearson Chi-Square	2,718	1	0,099		
Fisher's Exact Test				0,131	0,065

a. Prob(Kregða=pos) is greater for Ær=oboluset than boluset

Samantekt

Niðurstöður verkefnisins hafa varpað ljósi á þörfina á úttekt á tíðni kregðu á íslenskum sauðfjárbúum. Líklegt má teljast að ytri aðstæður, svo sem veðurfar, aðbúnaður og aðrar sýkingar, séu mikilvægur þáttur í því hvort og hversu mikil sjúkdómseinkenni sjást af völdum kregðusýkilsins. Árferðið var gott sumarið 2016 og getur það hafa átt sinn þátt í því að lítið var um alvarlegri kregðubreytingar. Margt er líka enn á huldu varðandi meingerð, hraða sjúkdómsframgangs og önnur mikilvæg atriði í sjúkdómssmynd kregðu.

Kregðubreytingarnar í þessari rannsókn voru í flestum tilfellum svo vægar að ekki er líklegt að þær hafi valdið klínískum einkennum. Aðeins í 4,5% tilfella af kregðu (kregðustig 4 og 5), þ.e. **0,6% af öllum sláturlömbum**, voru breytingarnar nægilega alvarlegar til að hafa haft teljandi áhrif á almennt heilsufar dýranna.

Vegna þessara mörgu vafaatriða teljum við ekki tímabært að halda áfram tilraunabólusetningum að sinni.

Æskilegra er að fara í kortlagningu kregðubreytinga í lungum sláturlamba og skoða þá einnig önnur landssvæði en þau sem þegar hafa verið tekin út (Þórarinsdóttir GE, 2014). Slíkar

rannsóknir þyrftu helst að ná yfir lengra tímabil, helst nokkur ár. Þessu til viðbótar þarf að vinna að rannsóknum á því hvernig smit á sér stað og hvernig fyrstu stigum sjúkdómsins vindur fram. Þetta þarf að skoða bæði við náttúrulegar aðstæður og með tilraunasmiti til að meta betur klínísk einkenni og vefjameinfræði kregðusmits og áhrif sjúkdómsins á heilsufar sauðfjár. Einnig verður að hafa í huga þátt ormasýkinga í þeim einkennum sem bændur verða varir við í sínum hjörðum. Mikilvægt er því að gera úttekt á tíðni og umfangi lungnaormasýkinga þ.m.t. ormalyfjaónæmi og afla þannig yfirgrípsmeiri þekkingar á orsökum öndunarfæraeinkenna í íslensku sauðfé.

Tilvitnanir

EMA/ CVMP/852/99-FINAL. Note for guidance - Field trials with veterinary vaccines

Friss NF *et al.* (1976). *Mycoplasma ovipneumoniae* demonstrated in Icelandic sheep. *Acta Vet Scand*, **17** 255-257

Gaylor E (2007). Maturity of the Lamb Immune System. Honors thesis.

Knight-Jones TJD *et al.* (2014). Veterinary and human vaccine evaluation methods. *Proc R Soc B*, **281** 2013-2839

Sheehan M *et al.* (2007). An aetiopathological study of chronic bronchopneumonia in lambs in Ireland, *Vet J*, **173** 630-637.

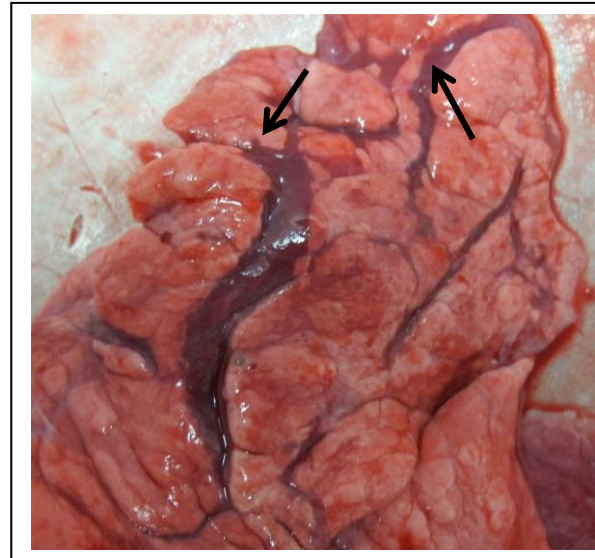
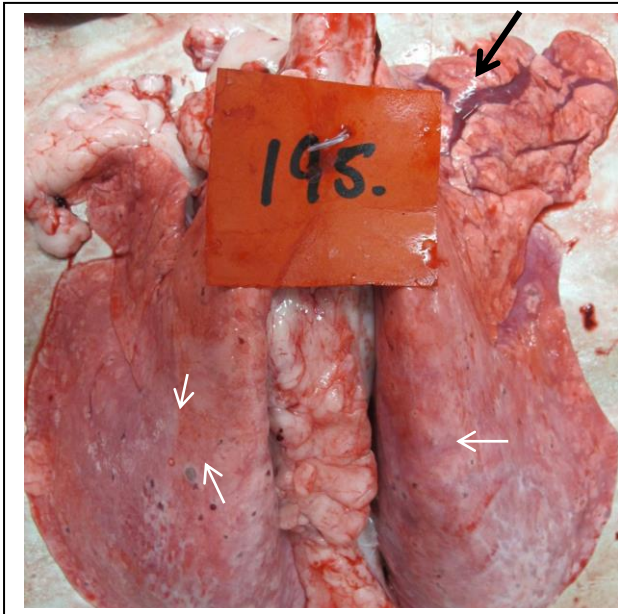
Ziegler JC *et al.* Safety and immunogenicity of a *Mycoplasma ovipneumoniae* bacterin for domestic sheep (*ovis aries*). *PLoS ONE* 9(4): e95698. doi:10.1371/journal.pone.0095698

Þórarinsdóttir GE (2014). Prevalence of bronchopneumonia in sheep in South-West to South-East Iceland; Slaughterhouse survey, Master's Thesis, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet Københavns Universitet

Viðaukar

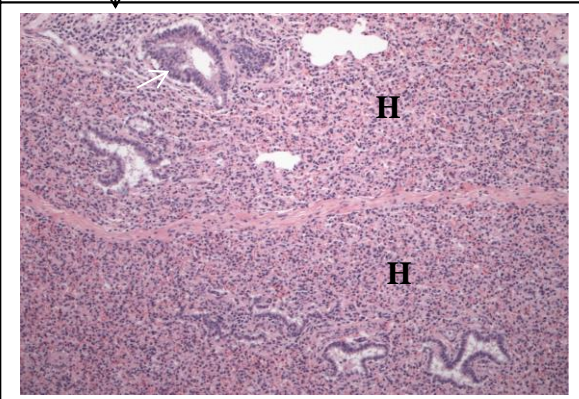
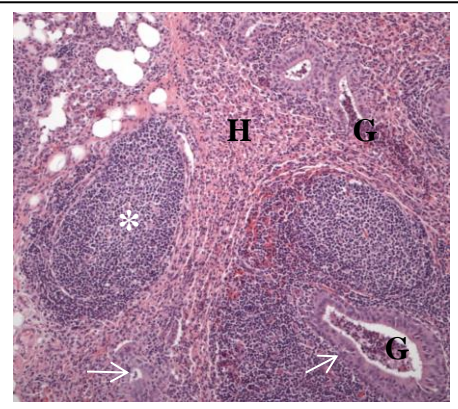
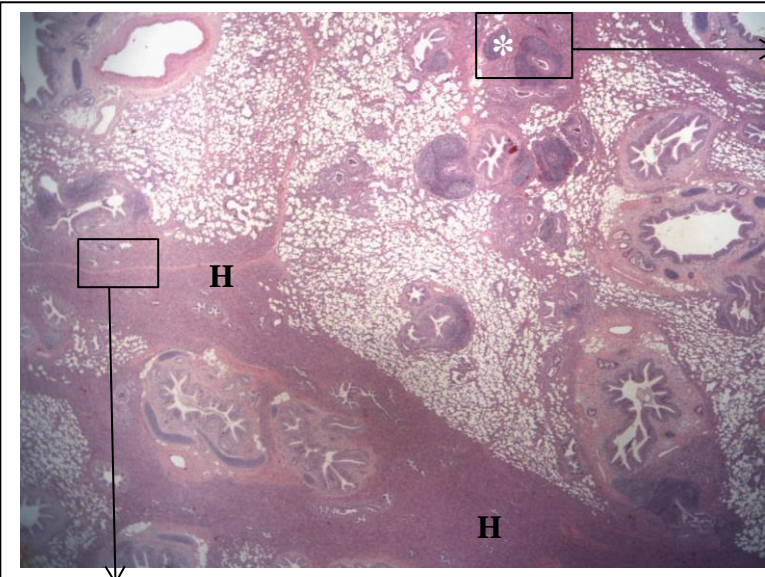
Viðauki 2: Myndir af lungum

Mynd 1: Kregðustig 1 (lungnahrún)



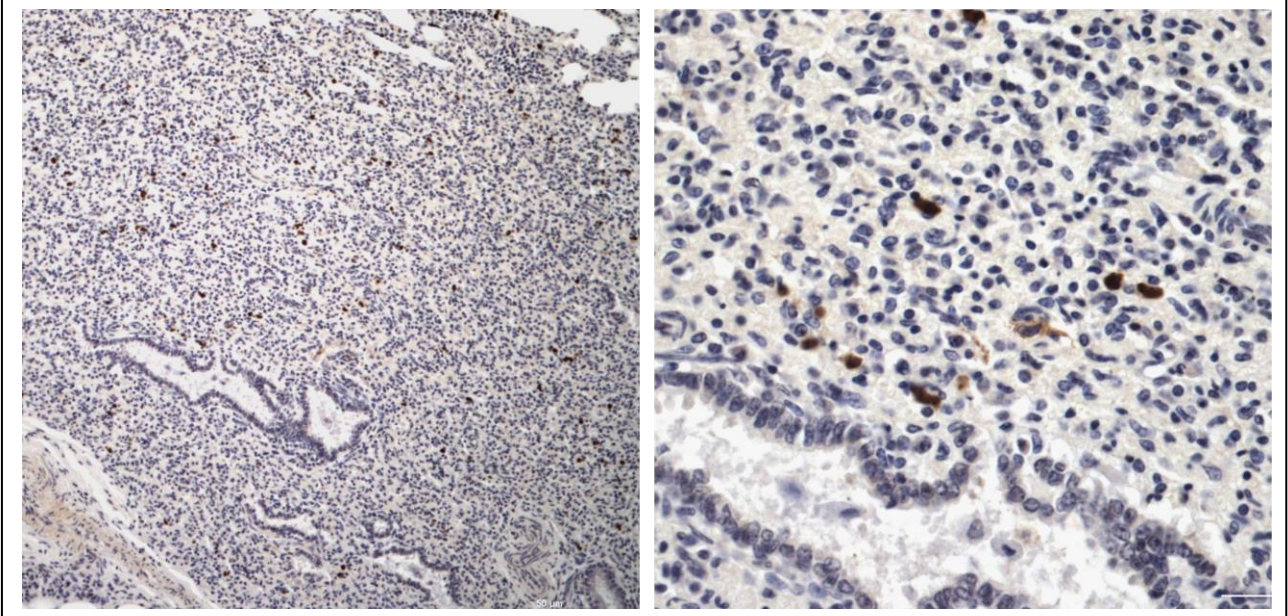
Ómeðhöndlað lamb. Kregðustig 1: lungnahrún í hægri framblaði (svartar pílur). Ormasýking í afturblöðum (hvítar pílur) – dreifð, rauðleit, hnúðótt svæði

Vefjabreytingar

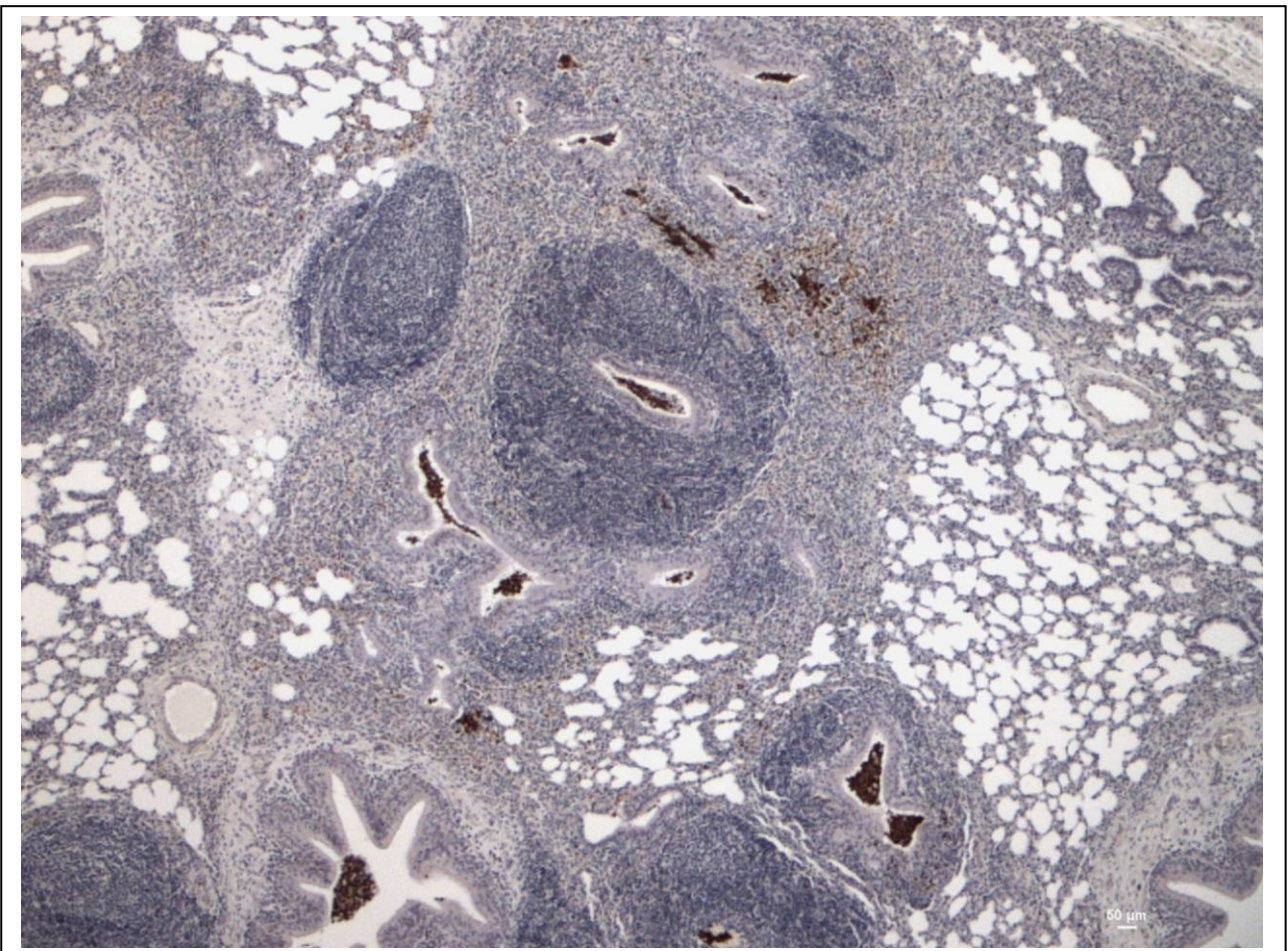


Berkjungabólga og lungnahrún (H). Graftarbólga í opi berkjunga (G) sem eru umkringdir stórum eitlingum (*). Ofvöxtur í slímhimnuþekju berkjunga (hvítar pílur)

Mótefnalitur

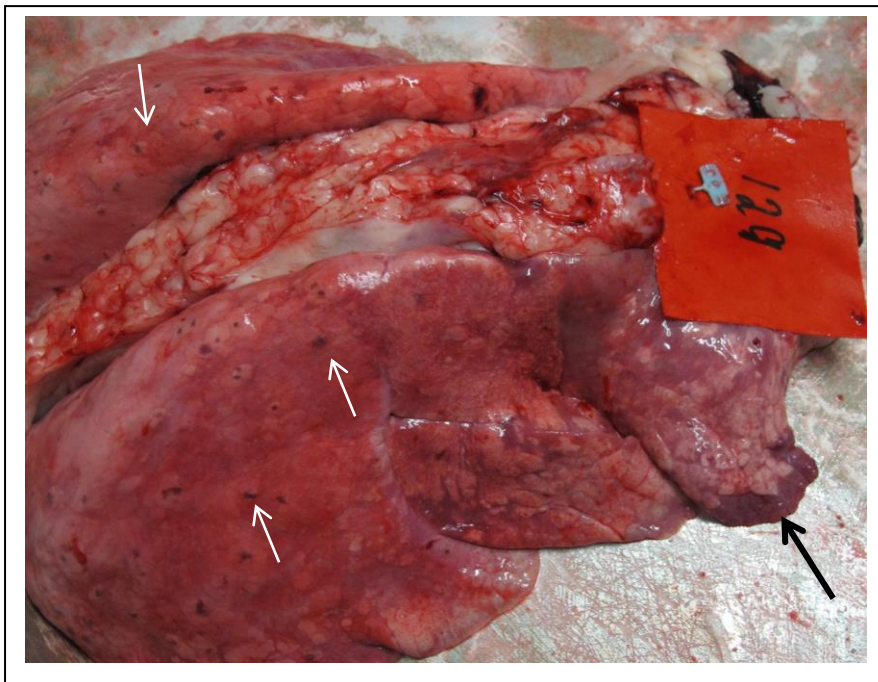


Einstaka jákvæðar frumur (brúnn litur) í samföllum lungnavef



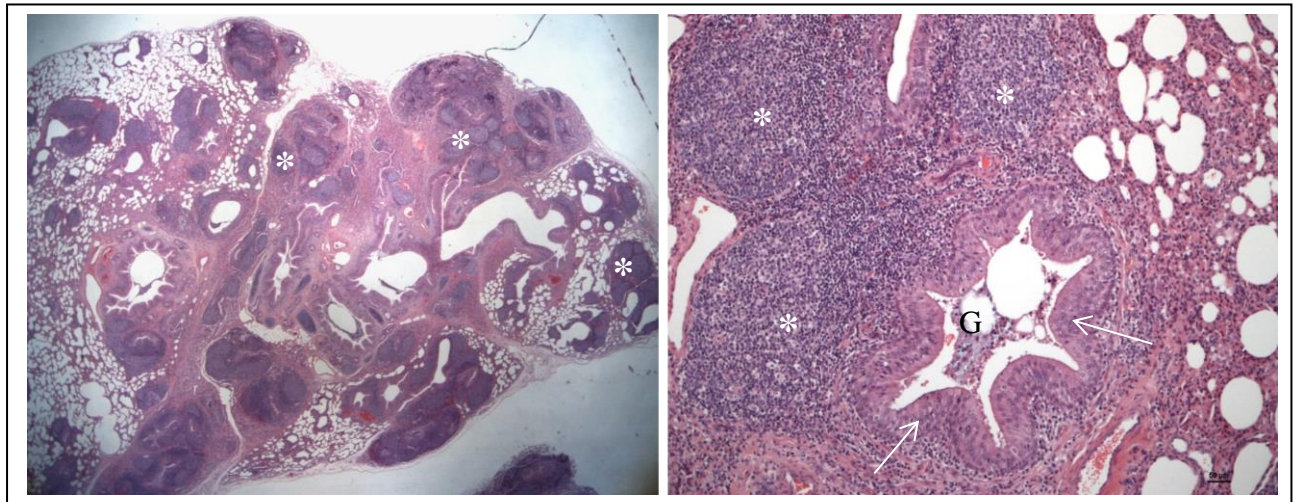
Margar jákvæðar frumur (brúnn litur) í opri berkjunga og á stökum svæðum í lungnavef

Mynd 2: Kregðustig 2 (1-3% af lungunum með bólgubreytingar)



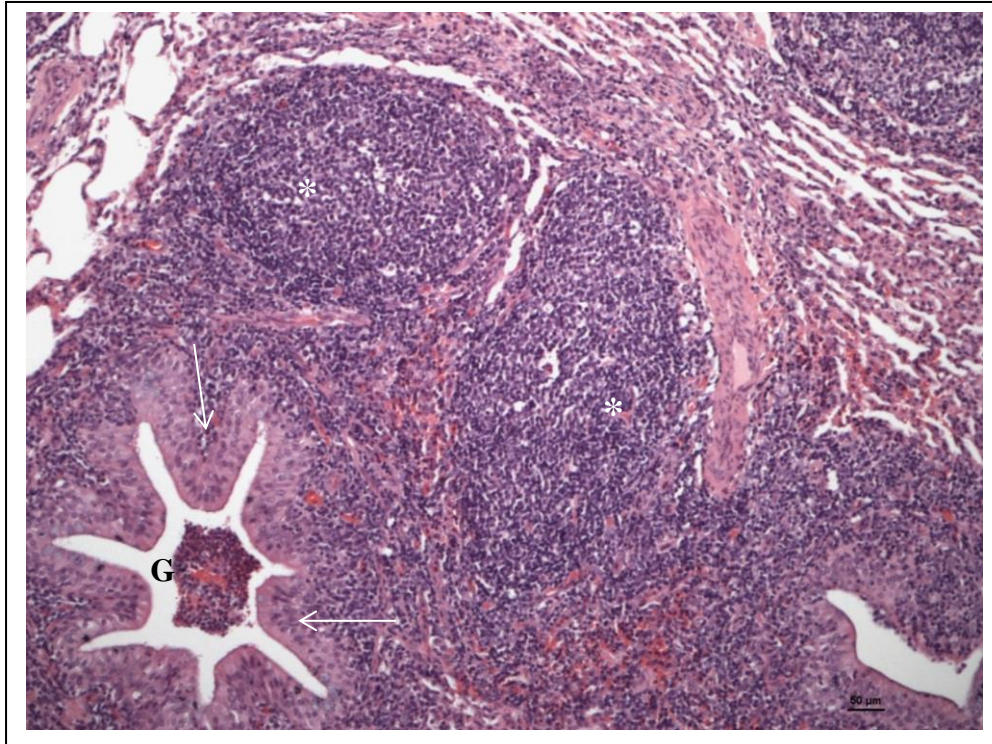
Ómeðhöndlað lamb.
Kregðustig 2: dökkrautt
bólguvæði yst í hægra
framblaði (svör píla).
Ormasýking í afturblöðum
(hvítar pílar) – dreifð,
rauðleit, hnúðótt svæði

Vefjabreytingar



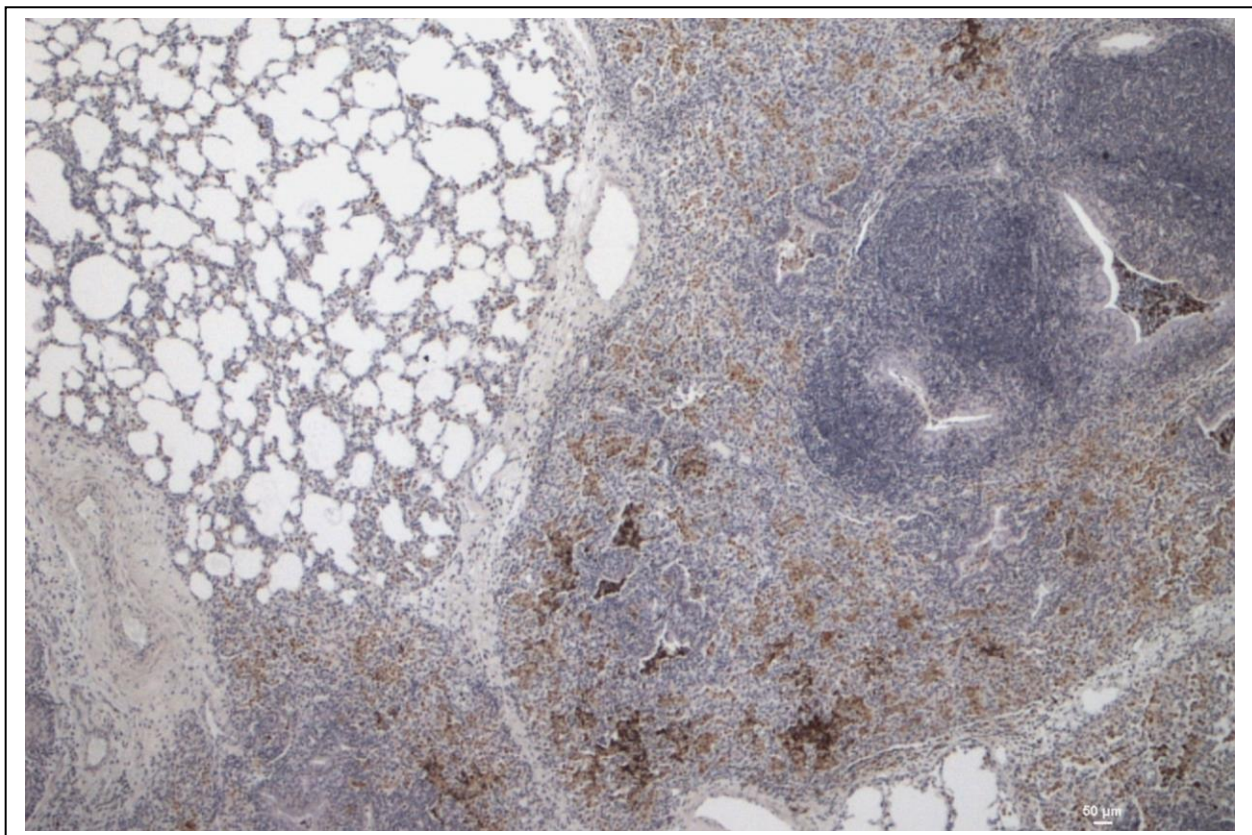
Langvinn graftarberkjungabólga og berkjulungnabólga. Stórir eitlingar (*) kringum berkjunga og vægur ofvöxtur í slímhimnuþekju (hvítar pílar). Slím og gröftur í opi berkjungs (G).

Vefjabreytingar



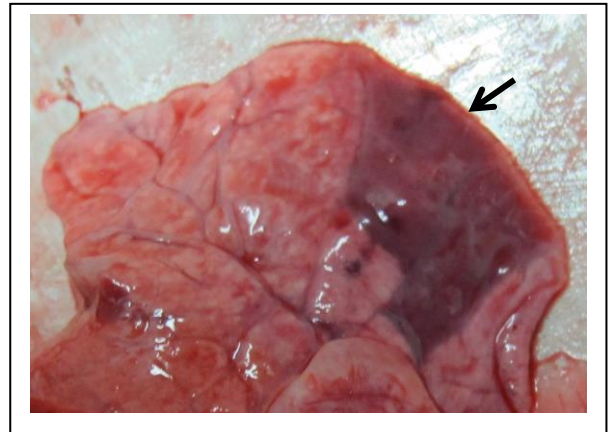
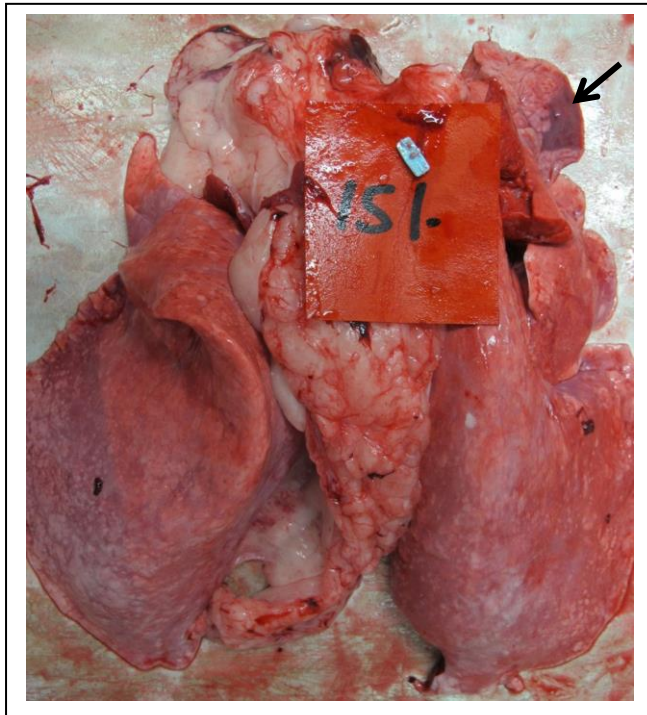
Langvinn graftarberkju-
lungnabólga. Stórir
eitlinga í kringum
berkjunga (*) og vægur
ofvöxtur í slímhimnu-
þekju (hvítar pílur).
Gröftur í opi berkjungs
(G).

Mótefnalitun



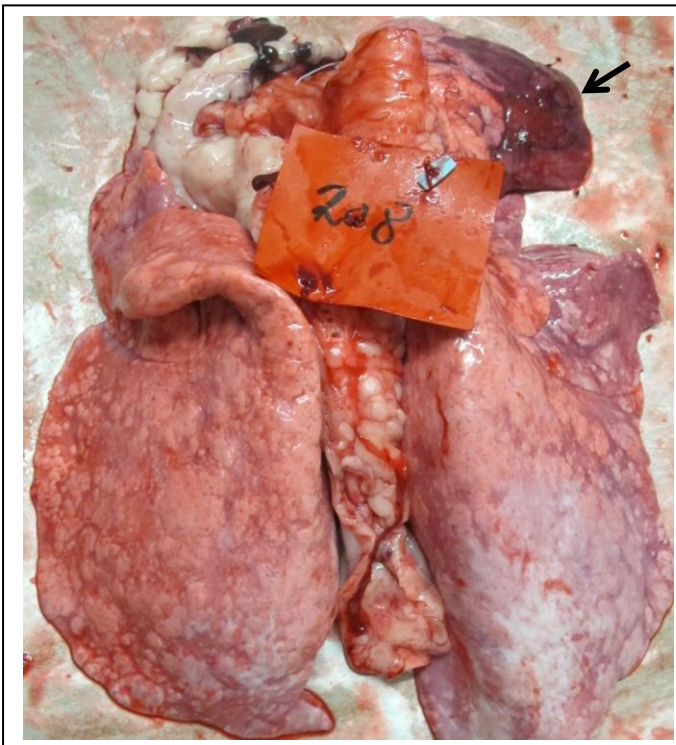
Margar jákvæðar frumur (kyrningar og átfrumur) í opi berkjunga og á bólgusvæðum í lungnavef

Mynd 4. Kregðustig 2 (1-2% af lungunum með bólgubreytingar)



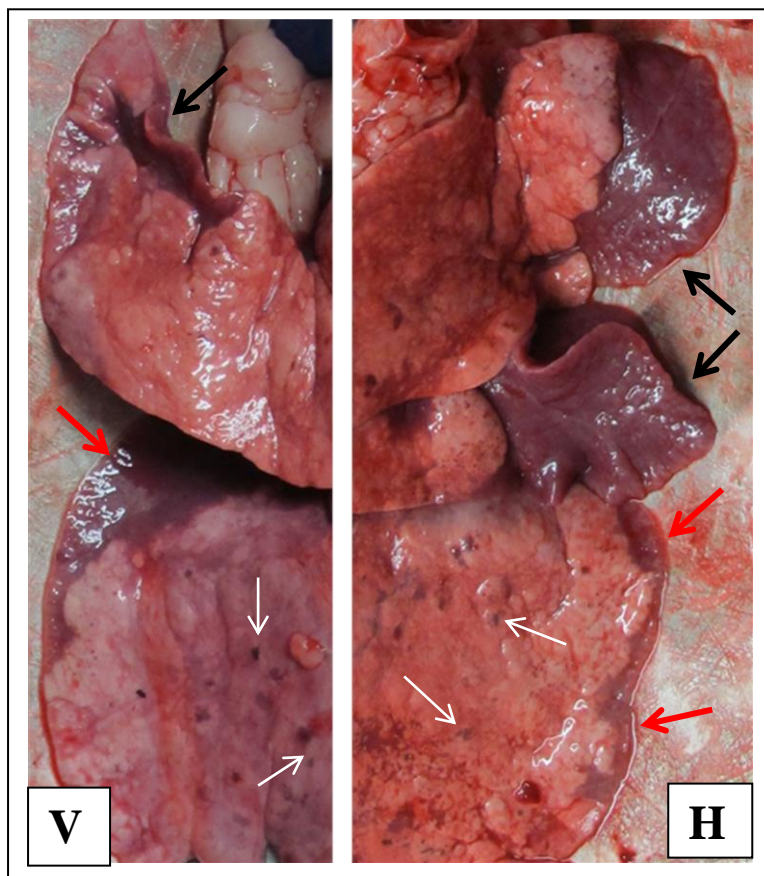
Ómeðhöndlað lamb. Kregðustig 2.
Dökkrautt bólgusvæði í hægra framblaði
(svört píla)

Mynd 5. Kregðustig 3 (3-9% af lungunum með bólgubreytingar)



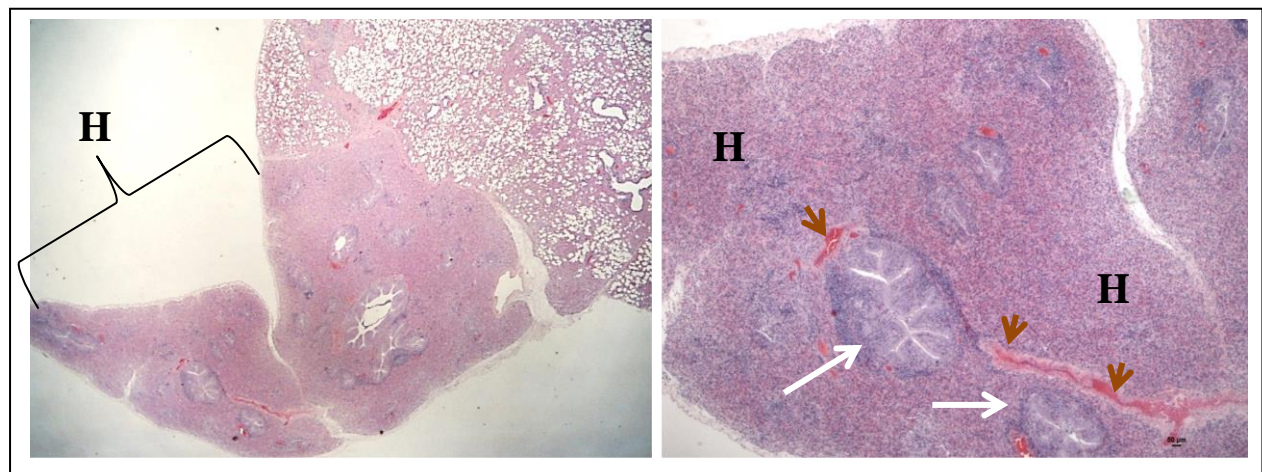
Lamb undan bólusettri á.
Kregðustig 3. Dökkrauður,
þrúttinn, dauslægur hluti
hægra framblaðs (svört
píla).

Mynd 6. Kregðustig 3 (3-9% af lungunum með bólgubreytingar)



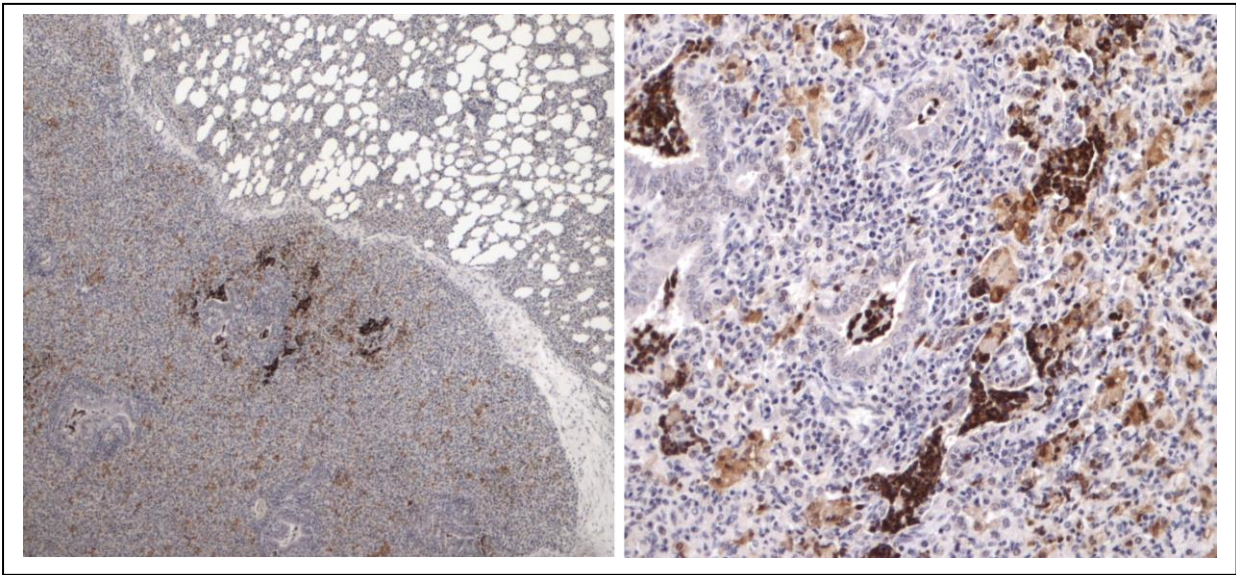
Tvíbólusettur tvílembingur.
 Kregðustig 3. Dökkrauð, þétt bólgusvæði í hægri og vinstri framlöðum (svartar pílur) og yst í dauslæga hlutum hægra og vinstra afturblaða (rauðar pílur). Sýklaræktun neikvæð. Ormasýking í afturblöðum (hvítar pílur) – dreifð, rauðleit, hnúðótt svæði
 H = hægra lunga
 V = vinstra lunga

Vefjabreytingar

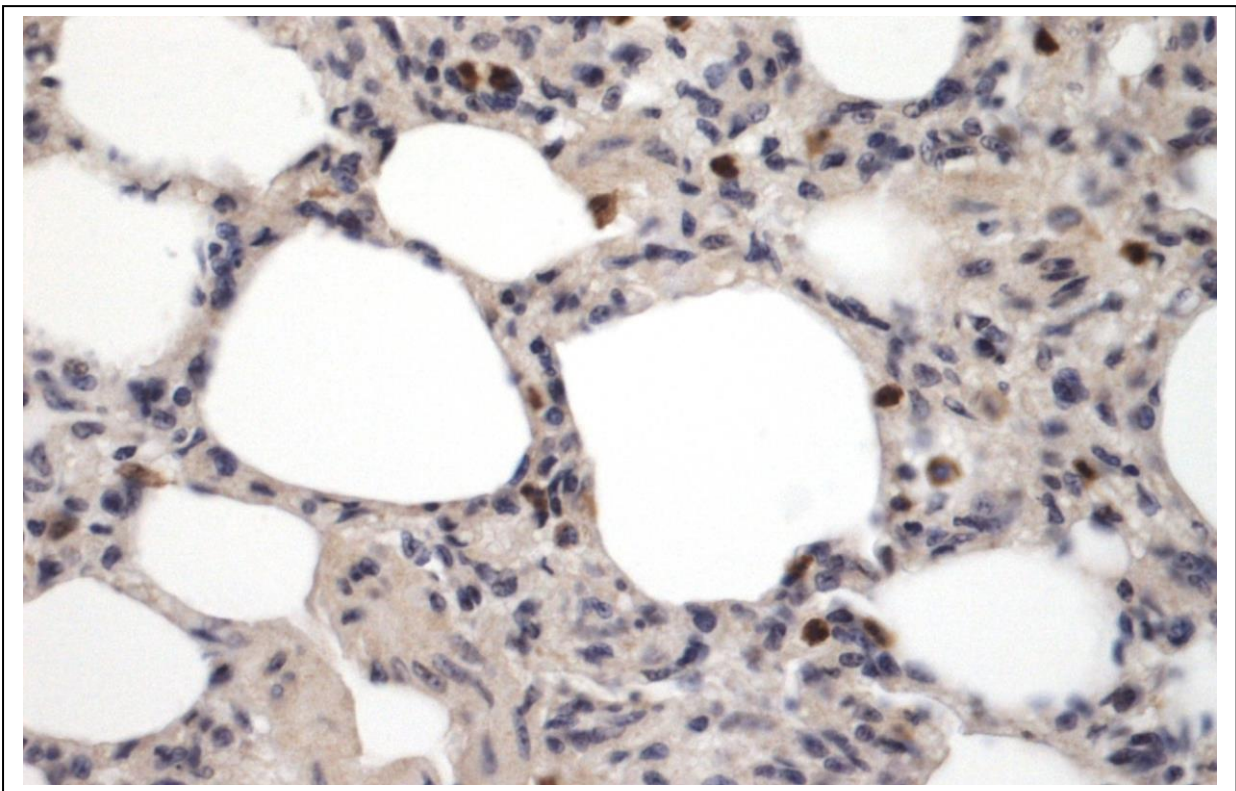


Langvinn berkjulungnabólga.
 Lungnahrún (H) yst í framblaði og ofvöxtur slímhimnuþekju (hvítar pílur). Blæðingar (stuttar appelsínugular pílur).

Mótefnalitun

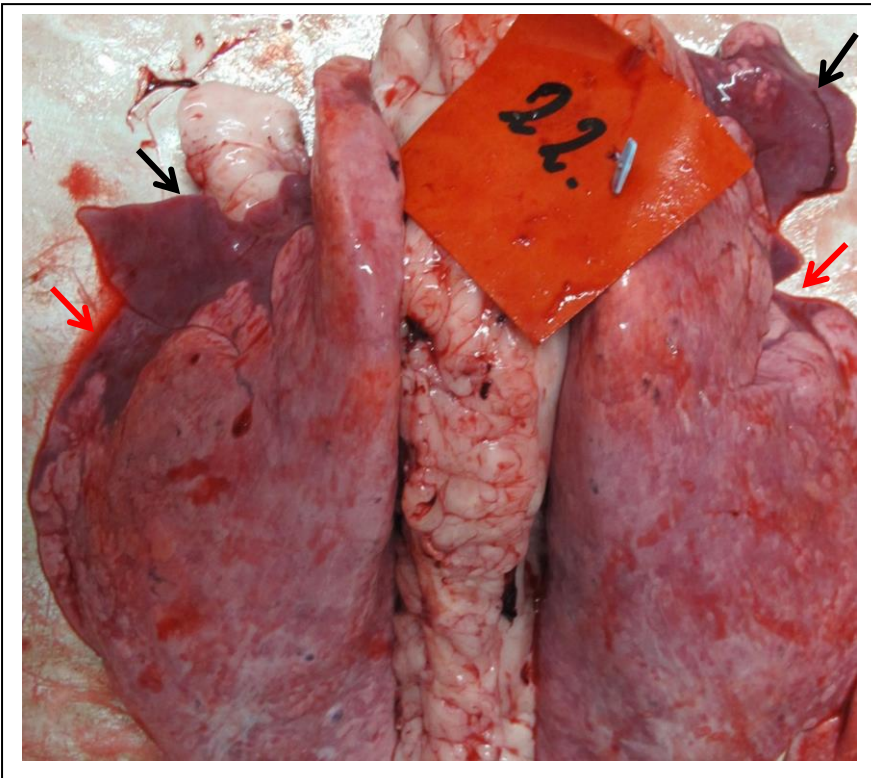


Jákvæðar frumur (kyrningar og átfrumur) í opi berkjunga og á bólgusvæðum í lungnavef



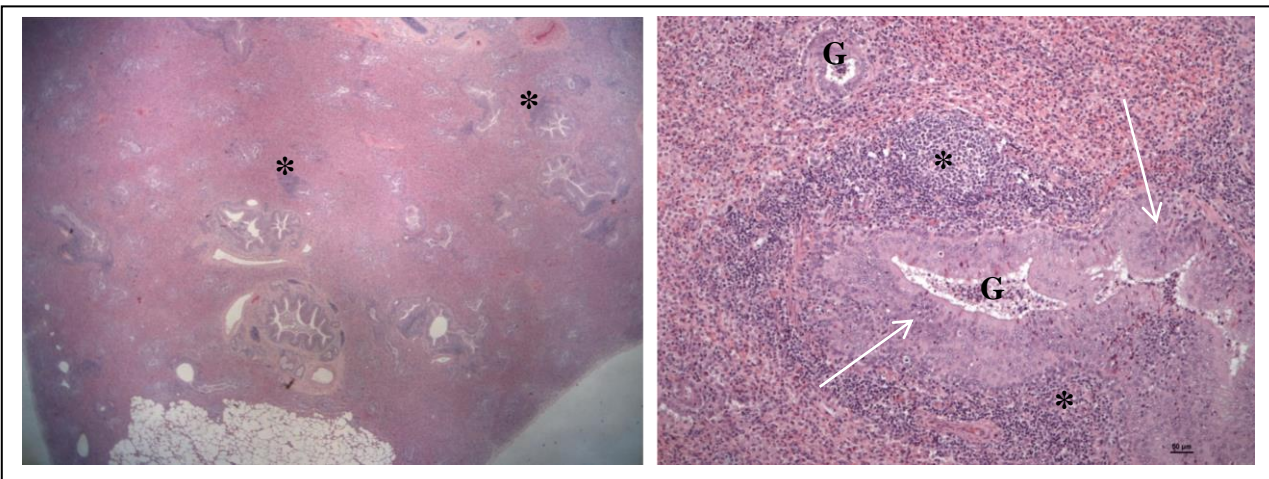
Dreifðar, jákvæðar frumur í lungnavef með væga bólgu og hrun

Mynd 7. Kregðustig 4 (10-20 % af lungunum með bólgubreytingar)



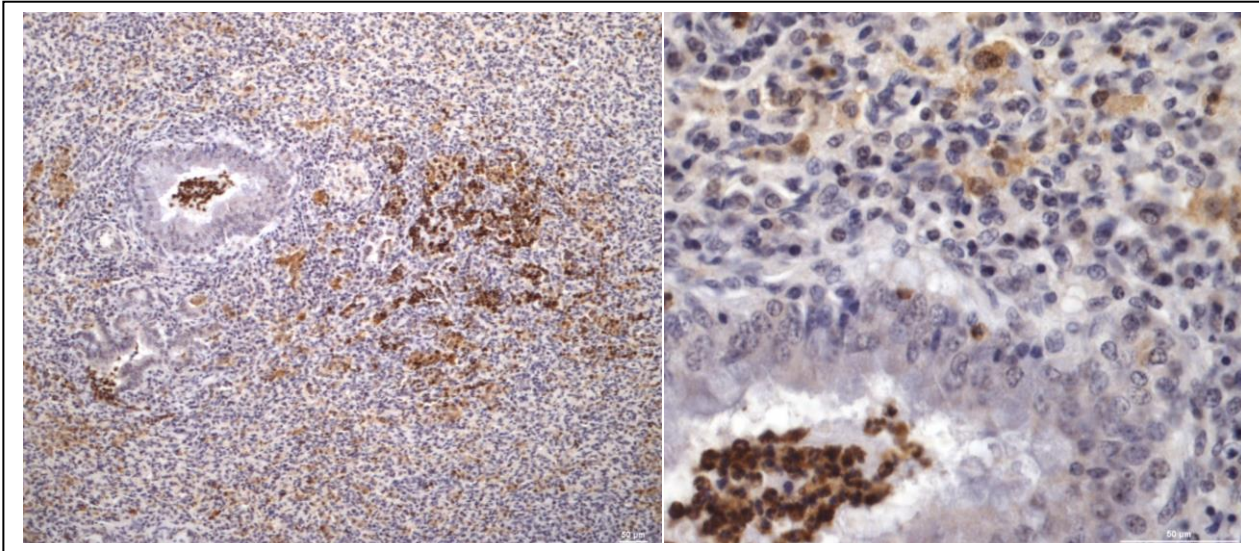
Ómeðhöndlað lamb.
Kregðustig 4. Dökkrauð
bólguvæði í báðum
framlöðum (svartar
pílur) og yst í dauslæga
hluta afturblaða (rauðar
pílur).
Sýklaræktun:
Pasteurella spp.

Vefjabreytingar



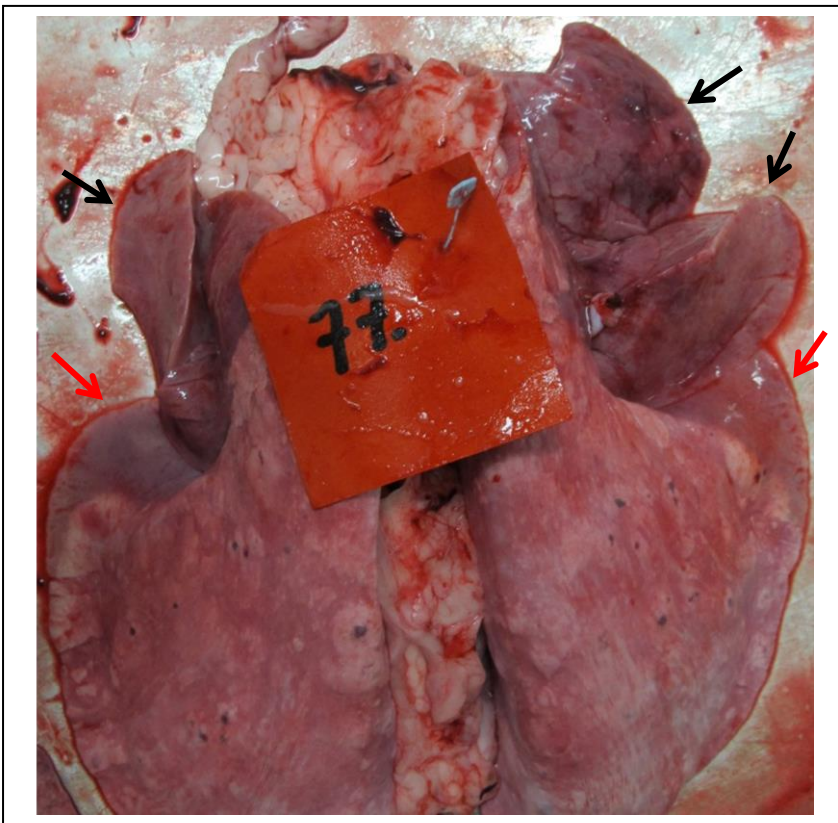
Vefjaskoðun: Langvinn berkjulungnabólga. Bólga og hrún í lungnavef, mikill ofvöxtur í slímhúðarþekju berkjunga (hvítar örvar) og miðlungs íferð af eitilfrumum í kringum berkjunga (*). Slím og/eða gröftur í opi berkjunga (G)

Mótefnalitun



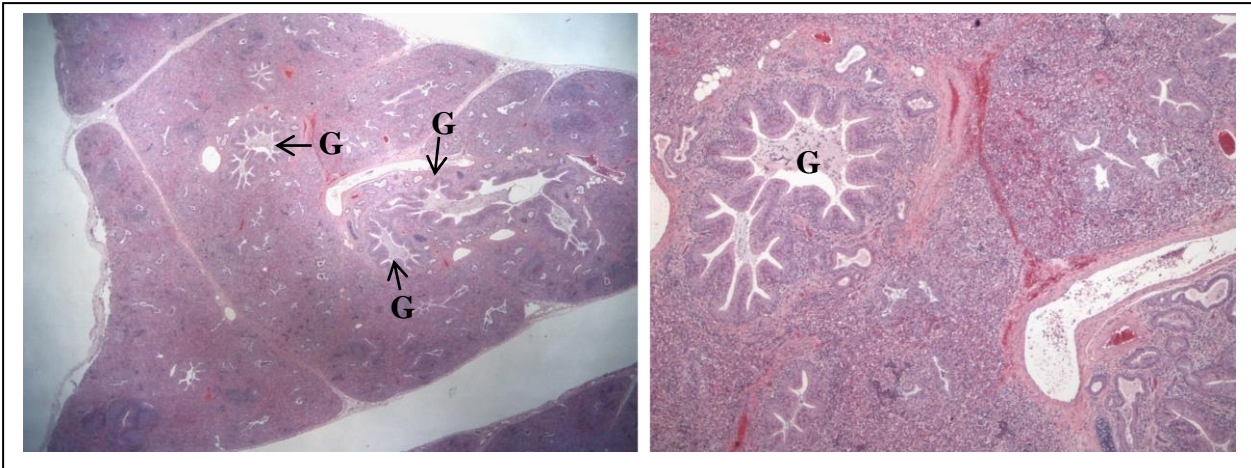
Margar jákvæðar frumur; aðallega kyrningar í berkjungum og átfrumum í lungnablöðrum)

Mynd 8. Kregðustig 5 (>20% af lungunum með bólgubreytingar)



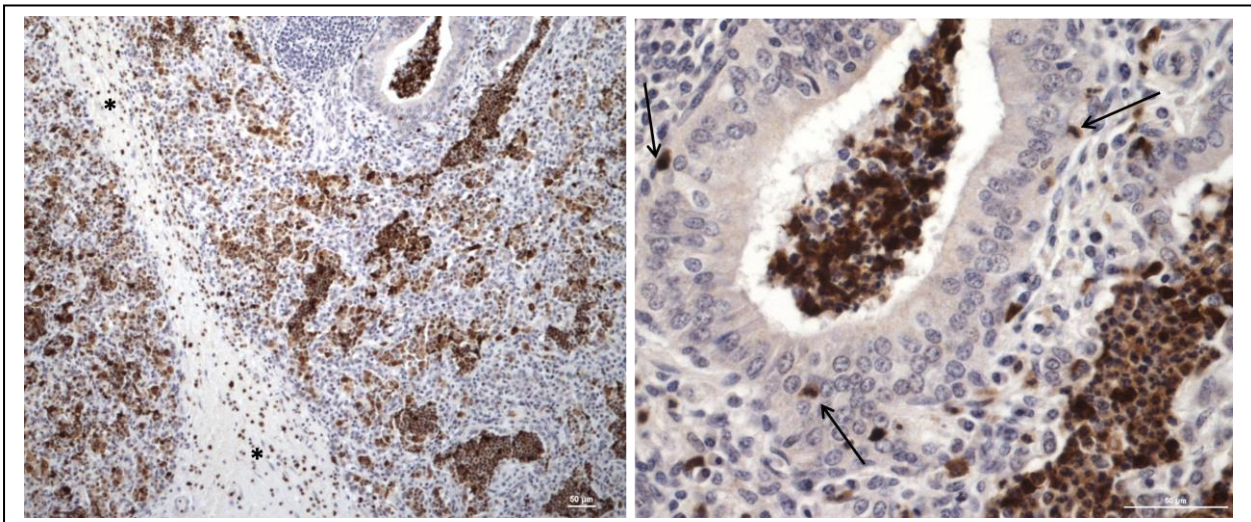
Ómeðhöndlað lamb.
Kregðustig 5. Dökkrauð, þrútin framblöð (svaratar pílur) og dökk svæði yst í dauslæga hluta afturblaða (rauðar pílur). Einnig lungnaormabreytingar. Sýklaræktun neikvæð.

Vefjabreytingar



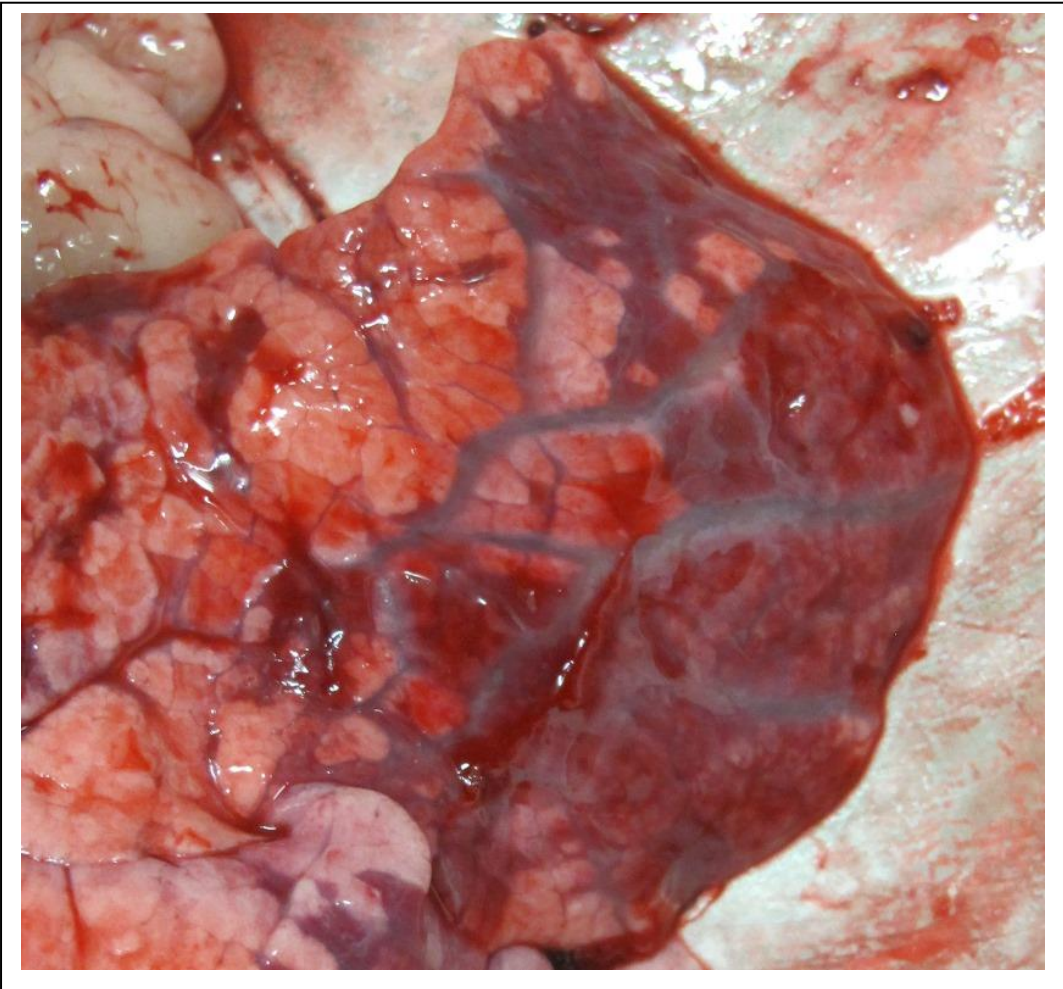
Langvinn, graftarberkjulungnabólga. Bólgan í lungnavefnum ekki sýnileg á þessari stækkun en greinileg þéttni lungnablóðrum. Ofvöxduktur í slímhúðarþekju, gróftur og töluvert slim í opi berkjunga (G og píla). Blæðingar (skær rautt)

Mótefnalitun



Margar jákvæðar frumur í opi berkjunga , í lungnavef og í millibleðlabandvef (*); bæði kyrningar og átfrumur. Mynd til hægri: Einnig stöku jákvæð fruma í slímhúðarþekju (pílur).

Mynd 9. *Pasteurella spp.* sýking (lungnapest)

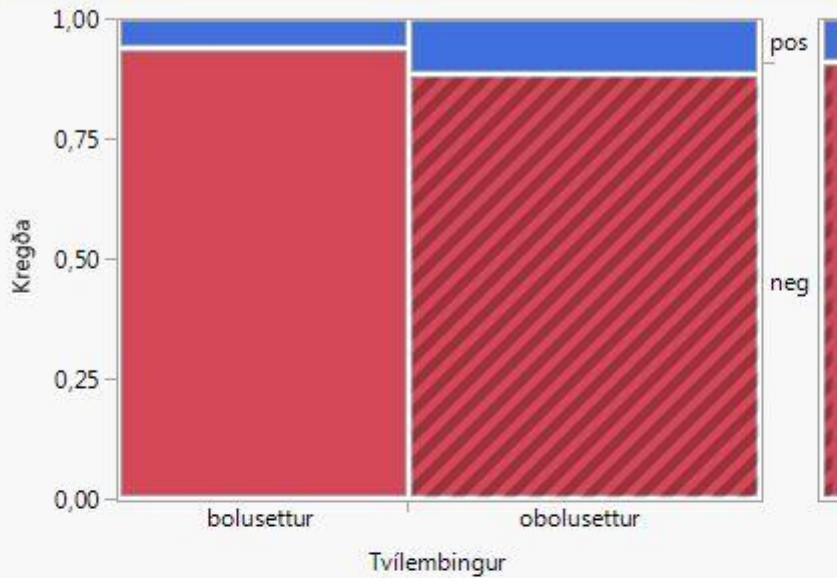


Óbólusettur tvílembingur. Ysti hluti hægra framblaðs dökkrauður. Staðsetning og útlit breytinga líkist kregðu en að auki er sýnilegur millibleðlabjúgur (svartar pílur). Vefjaskoðun sýndi bráða lungnabólgu sem samrýmdist lungnapest og engin merki um undirliggjandi kregðubólguþreyingar. Sýklaræktun: Hreinn vöxtur af *Pasteurella spp.*

Viðauki 3: Tölfræðiútreikningar

Contingency Analysis of Kregða By Tvilembingur

Mosaic Plot



Freq: Fjöldi

Contingency Table

		Kregða		Total
		neg	pos	
Tvilembingur	bolusettur	61	4	65
		42,66	2,80	45,45
		59,0909	5,90909	
obolusettur	69	9	78	
		48,25	6,29	54,55
		70,9091	7,09091	
Total		130	13	143
		90,91	9,09	

Tests

N	DF	-LogLike	RSquare (U)
143	1	0,64135407	0,0147

Test	ChiSquare	Prob> ChiSq
Likelihood Ratio	1,283	0,2574
Pearson	1,244	0,2647

Fisher's Exact Test	Prob	Alternative Hypothesis
Left	0,9225	Prob(Kregða=pos) is greater for Tvilembingur=bolusettur than obolusettur
Right	0,2065	Prob(Kregða=pos) is greater for Tvilembingur=obolusettur than bolusettur
2-Tail	0,3829	Prob(Kregða=pos) is different across Tvilembingur

