

Infektionsvägar för *Ascaridia galli* i ekologiska värphönsflockar

Projektansvariga: Johan Höglund (SLU) och Désirée Jansson (SVA)

Sammanfattning: Projektet har fortlöpt enligt plan under 2011. Under året har en Masterstudent rekryterats och en agronom hjälper till med provtagningen i ett av delprojekten. Samtliga delprojekt är påbörjade och har genererat preliminära resultat, varav ett delprojekt har slutförts 2011. Ett manus har skickats till en vetenskaplig tidskrift för granskning. Projektansvariga har även deltagit med en presentation i en internationell workshop "1st International *Ascaridia galli* workshop" i Köpenhamn, 1-2 februari 2012.

Bakgrund

Andelen svenska värphöns som är drabbade av spolmasken *Ascaridia galli* har ökat dramatiskt under det senaste decenniet. Det är uppenbart att detta har att göra med att smittspridningen gynnas i frigående hönsflockar där fåglarna lever i en miljö med intim mark- och/eller gödselkontakt. Enligt våra observationer infekteras fåglarna inte enbart i system där det finns tillgång till utevistelse, utan smittspridning tycks även ske till och inom flockar som endast vistas inomhus.

Det finns gamla uppgifter i litteraturen som säger att spolmaskägg kan vara infektionsdugliga i upp till tio år. Vår kunskap om äggens överlevnad och i vilka miljöer smittspridningen sker under svenska drifts- och klimatförhållanden är dock fortfarande begränsad och bygger på antaganden om att situationen i Sverige är identisk med den i andra länder. Det övergripande syftet med projektet är att undersöka förekomsten av spolmaskägg i ekologiska värphönsflockar genom smittspårning såväl inom- som utomhus. Parallellt genomförs experimentella studier som avser att belysa hur äggens utveckling och överlevnad påverkas av olika miljöfaktorer under standardiserade förhållanden. I utomhusförsöken följs förloppen i ett delprojekt vid upprepade tillfällen efter deposition av konstgjorda träckhögar med ett känt antal spolmaskägg, och i ett annat delprojekt görs kartläggning av spolmaskäggets förekomst, överlevnad och utveckling i naturligt smittade flockar. Vi utför även genetisk karakterisering av olika spolmaskisolat för att undersöka om metoden kan användas för smittspårning.

Projektet har nu pågått under ett år. Det bedrivs i samarbete mellan professor Johan Höglund vid BVF, sektionen för parasitologi (SLU), och fjäderfäveterinär VMD Désirée Jansson vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA). De parasitologiska analyserna har utförts vid BVF och delvis inom ramen för ett pågående mastersprojekt. Agronom Åsa Odelros genomför insamlingen av prover från fältet i ett delprojekt. Nedan redovisas det gångna årets aktiviteter.

Delstudie 1: laboratorieförsök

En serie laboratorieförsök har påbörjats. Till dags dato har vi studerat hur äggens utveckling påverkas vid olika temperaturer (5, 10, 15, 20, 25, 30 och 35°C). Försöken genomfördes med ägg som förvarades i vatten i cellodlingsflaskor vid konstanta temperaturförhållanden i inkubatorer. Resultaten är ännu inte bearbetade statistiskt, men enligt preliminära observationer sker ingen utveckling vid temperaturen $\leq 15^{\circ}\text{C}$. Den optimala temperaturen för äggens utveckling tycks ligga i intervallet 20-25°C.

Under innevarande och nästkommande år kommer resultaten att bearbetas statistiskt. Vi planerar även att avsluta påbörjade försök där vi studerar hur äggen påverkas av pH, syretillgång och luftfuktighet. Vi kommer även att undersöka hur äggen påverkas av

Interkokask[®] (klorokresol) vilket är ett desinfektionsmedel som används mot parasiter vid sanering av svenska värphönsstallar. Vi avser även att undersöka hur äggen påverkas *in vitro* när de exponeras för stigande koncentrationer av avmaskningsmedlet thiobendazol som modellsubstans.

Delstudie 2: utomhusförsök

För att belysa hur spolmaskäggen påverkas av olika väderförhållanden över tid när de deponeras utomhus pågår en experimentell studie där vi har placerat ut artificiella träckhögar på en försöksyta som aldrig tidigare varit i kontakt med fjäderfän. Träck från naturligt infekterade värphöns insamlades från infekterade värphönsanläggningar vid två tillfällen (april och oktober 2011). Efter noggrann omblandning tillverkades 24 artificiella träckhögar (å 500 g) vid respektive tillfälle och i vilka antalet maskägg räknades. De omsluts sedan av ett finmaskigt nät och delades slumpmässigt upp i tre likstora grupper och placerades på försöksytor (nedklippta gräsytor) som avgränsades av s.k pallbackar (Bild 1). För skydd mot gnagare utplacerade sorkpinnar och för skydd mot fåglar täcktes pallbackarna med hönsnät med maskstorleken 1,5 cm. Temperatur och relativ luftfuktighet registreras med regelbundna intervaller med Tiny Tag loggrar.

Analys av proverna utförs 1, 2, 5, 10, 15, 30 och 50 veckor efter deposition. Antalet överlevande parasitägg fastställs såväl i träck- som i jordprover tagna direkt under högarna (5 cm djup). Parasitäggen isoleras från jord genom att efter grundlig omblandning av provet över natt lösa upp 10 g jord i 0,5 M NaOH. Antalet parasitägg fastställs med en detektionsgräns på ett ägg i 10 g jord. Kvarvarande träck undersöks med modifierad McMaster-teknik med en lägsta detektionsgräns på ≥ 20 per gram träck (epg). Parasitäggen identifieras avseende art och utvecklingsstadium, dvs ägg med eller utan larv. Undersökningen av de träckprover som deponerades våren 2011 kommer att avslutas i maj 2012, medan höstprovtagningen avslutas i september 2012. Så här långt har provtagningen och den efterföljande undersökningen av proverna löpt planligt. Antalet ägg i högarna har varierat mellan 0 och 3650 epg, medan antalet i jordproverna har varierat mellan 0 och 66 ägg per gram jord.



Bild 1. Standardiserade träckhögar deponerades på en gräsyta våren respektive hösten 2011. Den gula dosan (pil) på insidan av den främsta pallbacken registrerar temperatur och luftfuktighet. I vänstra nedre hörnet syns ett sk lökjärn (★) som används för jordprovtagningen, medan en sk sorkpinne (▲) syns i mitten av det högra bildfältet. Foto: J. Höglund, SLU

Delstudie 3: studier i ekologiska värphönsflockar

Asikten med denna delstudie är att fastställa smittrycket i två ekologiska värphönsflockar genom att undersöka antalet spolmaskägg i träck- och jordprover som tas inom- och utomhus på ett standardiserat sätt. Därigenom kan vi utläsa i vilka miljöer som parasiten ägg utvecklas och överlever och var risken är störst för att hönsen ska smittas. Provtagningen sker både innan unghöns sätts in och därefter vid tre tillfällen jämnt fördelade under flockens liv. Prov som erhållits före ankomst av unghöns kommer att återspegla effekten av betesvila (rastgården/betet ska hållas fritt från höns under minst två månader mellan olika flockar enligt KRAV:s regelverk §5.4.12) och efter olika korrigerande åtgärder som har införts av djurägaren. Analys av proverna utförs på samma sätt som i delstudie 2. Under hösten 2011 påbörjades provtagning i två ekologiska värphönsbesättningar i Mellansverige. Enligt våra preliminära observationer påträffas spolmaskägg i båda besättningarna och på samtliga provtagningsplatser inom- och utomhus.

Delstudie 4: genetiska studier/DNA-fingeravtryck

Asikten med denna delstudie var att utvärdera ett molekylärt verktyg avseende användning för epidemiologiska studier och vid karakterisering av *Ascaridia galli*-isolat insamlade från olika gårdar. Den molekylära metod som nu utvärderats kallas Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), vilket är en mycket känslig och reproducerbar metod som baseras på information från hela maskens genom. Metoden har med framgång använts tidigare av vår forskargrupp för olika parasiter.

Vi har analyserat ett stort antal spolmaskar med AFLP för att kartlägga graden av genetisk variation mellan spolmaskar från tamhöns på olika svenska gårdar. De spolmaskar som vi har analyserat insamlades på ett slakteri eller vid diagnostiska obduktioner inom ramen för ett tidigare projekt och från värphöns och i ett fall även från slaktkycklingföräldrar. Dessutom ingick ett referensmaterial från Danmark. Från de allra flesta anläggningarna insamlades endast 10 spolmaskar från enskilda hönor men från en anläggning analyserades sammanlagt 60 spolmaskar från 6 olika hönor (10 maskar per höna). Avsikten med att undersöka ett större antal spolmaskar från samma flock var att ta reda på om det genetiska uttrycket skiljde sig mellan maskar från olika höns i samma flock.

Resultaten från analysen av tio spolmaskar från enskilda hönor från lika många anläggningar, visade att den genetiska mångfalden var relativt likartad oavsett maskarnas ursprung (0,081-0,132). Även mätningen av populationstrukturen ($F_{st} = 0,130$) indikerade att det fanns en relativt liten genetisk variation mellan spolmaskar från olika anläggningar. Denna beräkning stöddes även av den låga uppskattningen av de undersökta spolmaskarnas mutationshastighet ($4N_u = 0,092$), liksom av en ganska låg uppskattning av genflödet mellan de olika anläggningarna ($N_m = 1,68$). Slutligen visade testet för selektiv neutralitet att de undersökta spolmaskarna inte var utsatta för starkt genetisk urval.

Trots små genetiska skillnader mellan maskarna från de olika anläggningar fann vi att det var 87% sannolikhet för att korrekt identifiera vilken anläggning som varje spolmask kom från, vilket tyder på att det finns ett konsekvent mönster av genetisk variation inom och mellan gårdar. Dessa mönster undersöktes med hjälp av en nätverkanalys av de genetiska avstånden mellan de olika proverna. Analysen visar att de enskilda spolmaskarna från varje anläggning är i stort grupperade efter ursprung, även om vissa maskar ibland är genetiskt sett helt olika övriga maskar från samma gård. Under det innevarande året har resultaten sammanställts för publicering i en internationell tidskrift med refereesystem.

Övriga aktiviteter

Vi bedömer att spolmaksinfektion utgör ett betydelsefullt problem bland frigående värphöns, inklusive i ekologiska besättningar i Sverige. Det råder ingen tvekan om att problemet är manifest och/eller under uppseglande i rad andra EU-länder. I februari var vi (JH och DJ) inbjudna till The first International *Ascaridia galli* Workshop i Köpenhamn, som samlade i stort sett alla forskargrupper i Europa som för närvarande arbetar med denna problematik. Vi presenterade tidigare resultat och berättade även kort om vår pågående studie. Avsikten är att en ny workshop ska hållas 2013 (preliminärt i Göttingen) och förhoppningen är att det med gemensamma krafter kommer att vara möjligt att utveckla ett forskningsprogram med syfte att ta fram långsiktigt hållbara kontrollmetoder mot spolmask hos höns. Under 2011 har vi även hållit ett internt forskningsseminarium om *Ascaridia galli* på SLU.

Modifiering av projektet

Det har kommit till vår kännedom att man i vissa fall tvingas avmaska hönsen under pågående produktion även i ekologiska värphönsflockar för att undvika allvarliga hälsostörningar. Dessvärre har det visat sig att effekten efter avmaskning ofta är kortvarig. För att ta reda på vad detta kan bero är det nödvändigt att till en början genomföra en pilotstudie. Vi föreslår därför att vi inom ramen för det pågående projektet delvis omfördelar våra resurser så att en dylik studie kan genomföras.