

Infektionsvägar för *Ascaridia galli* i ekologiska värphönsflockar

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

Sammanfattning: Projektet har hittills fortlöpt planenligt. Under 2012 har två studier ingått som delar i ett Mastersprojekt och ett examensarbete på veterinärprogrammet. Datainsamlingen inom de flesta delprojekten är nu avslutad och de har genererat resultat som kommer att sammanställas för publicering under 2013. Resultaten från en delstudie är publicerade i en vetenskaplig tidskrift (2012). Projektansvariga har deltagit med resultat från projektet vid två möten med intressenter inom fjädernäringen. Dels vid en branchträff anordnad av SVA med olika förträdare för fjäderfänaeringen, dels vid en SLU-arrangerad kurs för ekologiska producenter och rådgivare. Dessutom har två forskningsansökningar sammanställts men som dessvärre avslagits. Detta trots goda vitsord.

Angreppen av spolmasken *Ascaridia galli* har ökat dramatiskt hos svenska värphöns under det senaste decenniet. Detta beror på att smittspridningen underlättas i frigående hönsflockar där fåglarna lever i en miljö med intim mark- och/eller gödselkontakt. Enligt våra tidigare 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 litteraturuppgifter som säger att spolmaskägg är 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 ofta 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. I ett av delprojekten följer vi dels äggens utveckling vid upprepade tillfällen utomhus efter deposition av konstgjorda träckhögar med ett känt antal spolmaskägg, dels kartlägger vi spolmaskäggeförekomsten i olika miljöer hos naturligt smittade flockar. Vi har även utfört genetisk karakterisering av olika spolmaskisolat för att ta reda om metoden kan användas vid smittspårning.

Projektet har nu pågått under två år i samarbete mellan professor Johan Höglund vid BVF, sektionen för parasitologi (SLU), och tf statsveterinärVMD Désirée Jansson vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA). De parasitologiska analyserna har utförts vid BVF, delvis inom ramen för ett nu avslutat mastersprojekt med veterinär Behdad Tarbiat och ett examensarbete på veterinärprogrammet med veterinärstudent Mikael Nylund. Agronom Åsa Odelros genomför insamlingen av prover från fältet. Nedan redovisas det gångna årets aktiviteter.

Delstudie 1: laboratorieförsök

En serie laboratorieförsök har nu avslutats där vi har studerat hur äggens utveckling påverkas vid olika temperaturer (5, 10, 15, 20, 25, 30, 33 och 35°C). Försöken genomfördes med ägg som förvarades i vatten i cellodlingsflaskor vid konstanta temperaturförhållanden i inkubatorer. Resultaten visar att ingen eller mycket långsam utveckling sker av äggen vid temperaturen <15°C. Den optimala temperaturen för äggens utveckling tycks ligga i intervallet 20-25°C. Preliminära försök visar även att äggen utvecklas efter frysning.

Vi har även avslutat försök där vi har studerat hur äggen påverkas av pH, syretillgång, luftfuktighet, och påverkas av Interkokask[®] (klorokresol) vilket är ett av flera

desinfektionsmedel som används mot parasiter vid sanering av svenska värphönsstallar. Resultat behöver kompletteras med ytterligare observationer framförallt vad gäller äggens utvecklingsförmåga vid varierande temperaturer. Under innevarande år kommer dessa data att (insamlas varefter resultaten kommer att) bearbetas statistiskt och sammanställas för publicering i en vetenskaplig tidskrift.

Delstudie 2: utomhusförsök

För att belysa hur spolmaskäggen påverkas av olika väderförhållanden över tid när de deponeras utomhus har en experimentell studie genomförts där vi placerade 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 omslöt 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 utfördes sedan 1, 2, 5, 10, 15, 30 och 50 veckor efter deposition. Antalet överlevande parasitägg fastställdes 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 räknades 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.



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

Undersökningen av träckprover som deponerades under våren och hösten 2011 avslutades i maj 2012, respektive september 2012. Antalet ägg i högarna varierade mellan 0 och 3650 epg,

medan antalet i jordproverna har varierat mellan 0 och 66 ägg per gram jord. Under innevarande år kommer resultaten att sammanställas och bearbetas statistiskt.

Delstudie 3: studier i ekologiska värphönsflockar

Asikten med denna delstudie som fortfarande är pågående, är att fastställa smittrycket i två ekologiska värphönsflockar genom att undersöka antalet spolmaskägg i träck- och jordprover insamlade inom- och utomhus på standardiserat vis. Därigenom kommer vi att kunna utläsa i vilka miljöer som parasiten ägg utvecklas och överlever, samt var riskerna är störst för att hönsen ska smittas. Provtagningen sker både innan unghöns sätts in och därefter vid tre tillfällen fördelade under flockens liv. Prov som erhållits före ankomst av unghöns återspeglar 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. Dessvärre har det på grund av svårigheter att rekrytera lämpliga flockar och i vissa fall rådande väderförhållanden visat sig vara svårare än väntat att samla in dessa prover. Försöket kommer dock att avslutas under innevarande år varefter resultaten kommer att sammanställas.

Delstudie 4: genetiska studier/DNA-fingeravtryck

I denna delstudie har vi utvärderat ett molekylärgenetiskt verktyg avseende användning för epidemiologiska studier och vid karakterisering av *Ascaridia galli*-isolat insamlade från olika gårdar. Den metod som vi nu har utvärderat kallas för Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), som baseras på information från hela maskens genom. Metoden har med framgång använts tidigare av vår forskargrupp för andra närbesläktade parasiter.

Spolmaskar har analyserats med AFLP och vi har därigenom kunnat kartlägga graden av genetisk variation hos ett stort antal spolmaskar från tamhöns från 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 10 maskar 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. Det genetiska mönstret analyserades med nätverkanalys som visar att enskilda

spolmaskarna från respektive anläggning är i stort grupperade efter samma ursprung, även om vissa maskar ibland är genetiskt sett helt olika övriga maskar från samma gård. AFLP-teknikens lämplighet för att kunna ta reda på ursprunget hos maskarna är dock begränsat. Resultaten publicerades under 2012 i "Parasite and Vectors" vilket är internationell open access tidskrift med refereesystem (impact 2.93).

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 har vi nyligen genomfört en pilotstudie på en anläggning och som även kommer att ligga till grund för ett examensarbete inom veterinärprogrammet. De preliminära resultaten visar att avmaskningen effektivt eliminerade masksmittan flocken med att infektionen återetablerades mycket snabbt efter avmaskning.

Övriga aktiviteter

Vid ett SVA-arrangerat möte i oktober 2012 med representanter för hela fjäderfäneringen informerade vi om aktiviteterna inom detta projekt och där vi visade på svårigheterna som är förenade med att kunna kontrollera spolmaskinfektion med hjälp av befintliga kontrollstrategier. Vi har därför i olika sammanhang föreslagit tillämpade forskningsprogram som syftar till att ta fram bättre och mer långsiktigt hållbara än dagens kontrollmetoder mot spolmask hos värphöns och där vi även avser att belysa om det finns risk för selektion av läkemedelsresistens. Dessvärre har vi fått avslag dels på en forskningansökan som skickades till ANIWhA tillsammans med danska och tyska kollegor. Vi fick även trots goda vitsord avslag på en liknande projektansökan som skickades till FORMAS. Projektansvariga har under året även deltagit i EPOK-seminarium 20 november i Skara (<http://www.slu.se/sv/centrumbildningar-och-projekt/epok-centrum-for-ekologisk-produktion-och-konsumtion/kalender/2012/11/utevistelse-och-parasiter-i-ekologisk-husdjursproduktion/>) och redovisat resultat från detta projekt.