Slutrapport 2014-01-29

Projekt:

Infektionsvägar för *Ascaridia galli* i ekologiska värphönsflockar

Projektledare:

- Professor Johan Höglund, BVF, Sektionen för parasitologi (SLU)

Projektdeltagare:

- Biträdande statsveterinär (fjäderfä) VMD, Dipl. ECPVS Désirée Jansson, Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA).
- Labtekniker Sofia Sollenberg, BVF, Sektionen för parasitologi (SLU)
- Forskningsingenjör Annie Engström, Sektionen för parasitologi (SLU)
- Agronom Åsa Odelros, Åsa Odelros AB.
- Masterstudent, veterinär Behdad Tarbiat
- Examensarbetare på veterinärprogrammet, Leg. Vet. Mikael Nylund

Uppdragsgivare: SLU-Ekoforsk

Bakgrund och motiv

Andelen svenska värphöns som är drabbade av spolmasken *Ascaridia galli* har ökat dramatiskt under det senaste decenniet (Jansson *et al*., 2010). Det är uppenbart att detta har att göra med att smittspridningen gynnas i hos frigående värphöns där fåglarna lever i en miljö med intim mark- och/eller gödselkontakt, som i Sverige främst representeras av KRAV-certifierade besättningar. Vi har beskrivit att värphöns med lätthet även kan bli infekterade i frigående system där flockarna endast vistas inomhus (Jansson *et al*., 2010; Höglund & Jansson, 2011).

Enligt litteraturuppgifter från 1930–60 talet, är spolmaskäggen mycket motståndskraftiga och de påstås vara infektionsdugliga upp till tio år. Kunskapen om äggens överlevnad och i vilka miljöer smittspridningen sker under svenska drifts- och klimatförhållanden var dock begränsad innan detta projekt initierades. Vår kännedom om smittspridningen bygger också på antagandet att spolmaskar som isoleras från värphöns i Sverige är identiska med de från andra länder. Projektet genomfördes för att öka kunskapen om parasitens spridningsbiologi under svenska förhållanden.

Syfte - nytta med projektet

Projektets övergripande syfte var att undersöka förekomsten och spridningsvägar av spolmaskägg i ekologiska värphönsflockar genom smittspårning. Dessa studier utfördes i fältbesättningar. Parallellt genomfördes experimentella studier för att belysa hur äggens utveckling och överlevnad påverkades av olika miljöfaktorer. I ett utomhusförsök följdes även utvecklingsförloppet efter deposition av konstgjorda träckhögar med ett känt antal spolmaskägg. Dessutom genomfördes genetisk karakterisering dels av olika spolmaskisolat från svenska gårdar, dels ett kontrollmaterial från Danmark. Vi har också efter modifiering av

den ursprungliga projektplanen, utfört en pilotstudie för att ta reda på hur spolmasken påverkas av flubendazol, vilket är det enda avmaskningsmedlet mot spolmask som finns att tillgå idag. Denna delstudie har medfinansierats av Jordbruksverket.

I projektet ingick sammanlagt fem olika delstudier som redovisas separat nedan. I rapporten har vi bara tagit med figurer som ännu inte finns redovisade i andra rapporter och publikationer från projektet.

Genomförande

Delstudie 1: laboratorieförsök: En serie laboratorieförsök genomfördes och är redovisade såväl i en Masteruppsats av veterinär Behdad Tarbiat vid SLU som ett vetenskapligt manuskript som har skickats för granskning till tidskriften Parasitology i december 2013 (se resultatförmedling).

Påverkan på spolmaskäggens utveckling (embryoneringsprocessen) undersöktes både vid olika konstanta temperaturer (5, 10, 13, 15, 20, 25 , 30, 33 och 35°C), och vid fluktuerande temperaturer (mellan -5 och 25 °C, vilket representerar temperaturförhållanden på försommaren i tempererat klimat, respektive vid fluktuerande temperatur kring fryspunkten).

Försöken genomfördes med spolmaskägg som insamlades från två kommersiella värphönsflockar. Parasitäggen placerades i vatten i provrör eller i cellodlingsflaskor som förvarades vid olika temperaturförhållanden i inkubatorer. Dessutom undersökte vi hur äggen påverkades av pH (inklusive extremvärden), brist på syre och relativ luftfuktighet, samt påverkan av Interkokask® (klorokresol) som är ett desinfektionsmedel som används mot parasitägg vid sanering av svenska värphönsstallar.

Delstudie 2: utomhusförsök: För att belysa hur spolmaskäggen påverkades av olika väderförhållanden över tid efter deponering utomhus, genomfördes en experimentell studie där artificiella träckhögar med ett känt antal parasitägg placerades på olika försöksytor som aldrig tidigare varit i kontakt med fjäderfän. Högarna tillverkades av träck från naturligt infekterade värphöns insamlades från kommersiella värphönsanläggningar. Efter noggrann omblandning tillverkades 24 artificiella träckhögar (à 500 g) vid respektive tillfälle i vilka antalet maskägg räknades. Högarna var omslutna av ett finmaskigt nät och fördelades slumpmässigt i tre likstora grupper som placerades på nedklippta gräsytor som avgränsansades av s.k pallbackar (Bild 1), Detta gjordes vid två olika tillfällen dels i april 2011, dels i oktober 2011. För skydd mot gnagare utplacerade sorkpinnar och pallbackarna täcktes med hönsnät med maskstorleken 1,5 cm för att utestänga vilda fåglar. Temperatur och relativ luftfuktighet registrerades med regelbundna intervall med Tiny Tag loggar. Analys av proverna utfördes 1, 2, 5, 10, 15, 30 och 50 veckor efter deposition. Antalet överlevande parasitägg fastställdes både i den kvarvarande träcken och i jordprover som togs på ett standardiserat vis med ett sk lökjärn direkt under högarna ned till cirka 5 cm djup. Parasitäggen isolerades från jord genom att efter grundlig omblandning av provet över natt

lösa upp 10 g jord i 0,5 M NaOH och parasitäggen räknades med en detektionsgräns på ett parasitägg i 10 g jord. Kvarvarande träck undersöktes med modifierad McMaster-teknik med en lägsta detektionsgräns på ≥20 per gram träck (epg). Utvecklingsstadiet (dvs ägg med eller utan larv) identifierades hos påvisade parasitägg av *A. galli*.

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

Delstudie 3: fältstudier i ekologiska värphönsflockar: I detta delprojekt ingick två KRAV-certifierade värphönsbesättningar i mellersta Sverige. Smittrycket fastställdes genom att undersöka antalet spolmaskägg i träck- och jordprover som insamlades på ett standardiserat sätt både inom- och utomhus. Avsikten var att utläsa i vilka miljöer som parasiten ägg utvecklas och överlever och var risken är störst för att hönsen ska smittas. Proven från hönshusens inomhusmiljö samlades från spalt/sittpinnar respektive golv/ströbädd. Cirka 50 enskilda prover poolades och blandades från respektive yta. Utomhus togs prover på standardiserat vis från verandan, en yta utanför verandan (10–30 m utanför hönshuset) samt i rastgårdens bortre del inklusive vid eventuella skydd (hyddor) mot väder och vind. Varje prov bestod av 25 delprov som blandades och underprov analyserades från dessa. Enligt planen skulle proverna tas innan den nya flocken sattes in, samt 10, 30 och 60 veckor efter insättningen. Proverna före ankomsten av unghönsen visar effekten av betesvila (rastgården/betet ska hållas fritt från höns under minst två månader mellan olika flockar enligt KRAV:s regelverk §5.4.13) och efter olika korrigerande åtgärder (t ex desinfektion) av djurägaren. Analys av proverna utfördes på samma sätt som i delstudie 2.

Delstudie 4: genetiska studier: I denna delstudie (som redovisas mer utförligt i en vetenskaplig publikation, se nedan) användes ett molekylärbiologiskt verktyg, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), för genetisk karakterisering av *A. galli*-isolat från olika gårdar. AFLP är en känslig och reproducerbar metod som ger information om hela maskgenomet som ger ett DNA-fingeravtryck för varje enskild mask. Ett stort antal spolmaskar analyserades med AFLP för att kartlägga graden av genetisk variation mellan spolmaskar från tamhöns på olika svenska gårdar. Maskarna insamlades från värphöns på ett slakteri, i samband med diagnostiska obduktioner på SVA, och i ett fall från slaktkycklingföräldrar från ett avelsföretag. Dessutom ingick ett referensmaterial från Danmark i studien. Från de allra flesta anläggningarna insamlades 10 spolmaskar från enskilda hönor. Från en anläggning analyserades sammanlagt 60 spolmaskar från 6 olika hönor (10 maskar per höna), för att ta reda på om det genetiska uttrycket skiljde sig mellan maskar från olika höns i samma flock.

Delstudie 5: pilotstudie avmaskning: Som ett sista delprojekt genomfördes tillsammans med en veterinärstudent (Mikael Nylund, examensarbete på veterinärprogrammet, SLU) en pilotundersökning av avmaskningseffekt i en fältbesättning med värphöns i Mellansverige. Detta projekt har under sommaren 2013 kompletterats med ytterligare en flock samt omfattande farmakologiska analyser avseende flubendazol och dess metaboliter i blodplasma, tarminnehåll och dricksvatten. Den senare delen av projektet har finansierats med medel från Jordbruksverket. Sammanställning av resultaten kommer att göras under våren 2014 inför publicering.

Här redovisas pilotstudien, dvs provtagning och parasitologiska analyser från den första flocken som genomfördes hösten 2012. Effekten av flubendazol (Verminator®) mot tamhönans spolmask *A. galli* undersöktes i en flock med frigående värphöns inomhus från en kommersiell anläggning belägen i mellersta Sverige. I den aktuella besättningen hölls flockarna inomhus med NATURA-Nova-inredning (flervåningssystem) och ströbädd. Flocken konstaterades vara monospecifikt infekterad med *A. galli* före försöksstart via träckprovsundersökning och för artbestämning med qPCR. Syftena var att dels undersöka effekten av avmaskning med flubendazol mot samtliga utvecklingsstadier hos *A. galli* eftersom denna information inte finns vetenskapligt belagd, dels att ta reda på hur snabbt efter avmaskningen som flocken återinfekterades genom att studera tidsaspekter i parasitens livscykel. Försöket startade när när hönorna var 67 veckor gamla och enligt djurägarens beslut skulle amaskas.

Flocken avmaskades med flubendazol via dricksvattnet under några timmar dagligen i totalt sju dagar enligt tillverkarens rekommendation. Försöket pågick därefter fram till dess att hönorna åter utskiljde parasitägg och vuxna spolmaskar fanns etablerade i tunntarmen hos minst en individ. Under försöket samlades poolade träckprov från gödselbanden vid totalt åtta tillfällen för analys av antalet parasitägg i ren gödsel. Dessutom insamlades tarmar och

tarminnehåll från kolon och kloak från tio slumpmässigt utvalda hönor per undersökningstillfälle för parasitologisk analys. Både McMaster- och Mini-FLOTAC®-metoden användes för räkning av antalet parasitägg i tarminnehållet. Histotropa larver i tarmslemhinnan (mukosan) påvisades med en modifierad agargel-inkubationsmetod. Denna metod är arbetskrävande, men har fördelen att enbart identifiera larver som är opåverkade av avmaskningsmedlet eftersom metoden förutsätter att larverna är motila (viabla). De olika utvecklingsstadierna i tarmlumen påvisades efter silning av tarminnehållet genom okulär undersökning med stereomikroskop.

Resultatet och slutsatser

Delstudie 1: Resultaten från laboratorieförsöken visade att ingen eller mycket långsam utveckling sker av parasitäggen vid temperaturer ≤15°C. Den nedre gränsen för äggutveckling fastställdes till en temperatur mellan 13 och 15°C, vilket är lägre än vid tidigare vetenskapliga studier där embryonering inte har påvisats vid en temperatur på 15°C eller lägre. Vid temperaturer mellan 20 och 30°C utvecklades 83–96% av parasitäggen till det infektiva stadiet inom 1–3 veckor. Vid högre temperaturer hämmades parasitäggen utveckling men kunde fortfarande ske långsamt hos en mindre andel parasitägg vid 35°C, vilken är en högre temperatur än vad som rapporterats i tidigare undersökningar. Det visade sig också att äggen kunde utvecklas efter en kortare tids frysning samt efter upprepade temperaturfluktuationer kring fryspunkten och vid dagliga fluktuationer mellan 5 och 25°C, vilket tidigare inte har studerats för denna parasitart. Det visade sig att parasitäggen var syrekrävande, men de kunde överleva en tid i anaerob miljö, för att vidareutvecklas efter överföring till syrerik miljö. Vi kunde även visa att embryoneringen krävde hög relativ luftfuktighet.

Desinfektionsmedlet Interkokask® (klorokresol) som är ett av de medel som används idag för att eliminera parasitägg i hönshus hade ovocid påverkan även vid en lägre koncentration (1 %) än den rekommenderade (2 %). Däremot sågs ingen negativ effekt på parasitäggens embryonering inom det undersökta pH-intervallet (2.5–12,5).

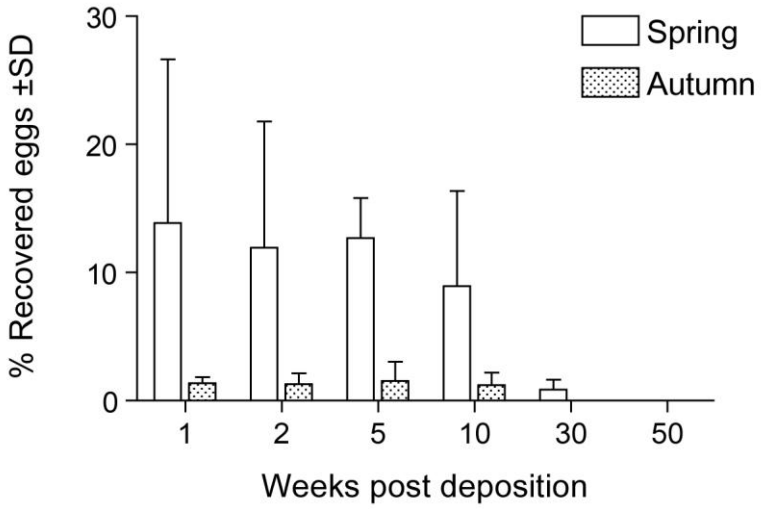
Sammantaget visade denna studie att ägg av hönans spolmask kan embryonera under rådande förhållanden (huvudsakligen temperatur och relativ fuktighet) i hönshus i princip under hela året. Slutsatsen baserades på tidigare utförda temperaturmätningar i hönshus med värphöns i Sverige (Höglund & Jansson, 2011).

Delstudie 2: Undersökningen av de träckprover som deponerades utomhus redovisas i Figurerna 1–2. Medelantalet spolmaskägg I tröckhögarena vid försökets start var 2264 epg (ägg per gram). Sammanfattningsvis påträffades flest antal maskägg i de kvarvarande träckhögarna. Däremot påträffades parasitägg endast sporadiskt i det underliggande jordskicket. Medelantalet återfunna ägg i den kvarvarande träcken var 1005 epg, men endast 5 epg i jorden. Det var även en signifikant skillnad mellan de träckhögar som deponerades under våren (april 2011), respektive under hösten (oktober 2011). Antalet var signifikant

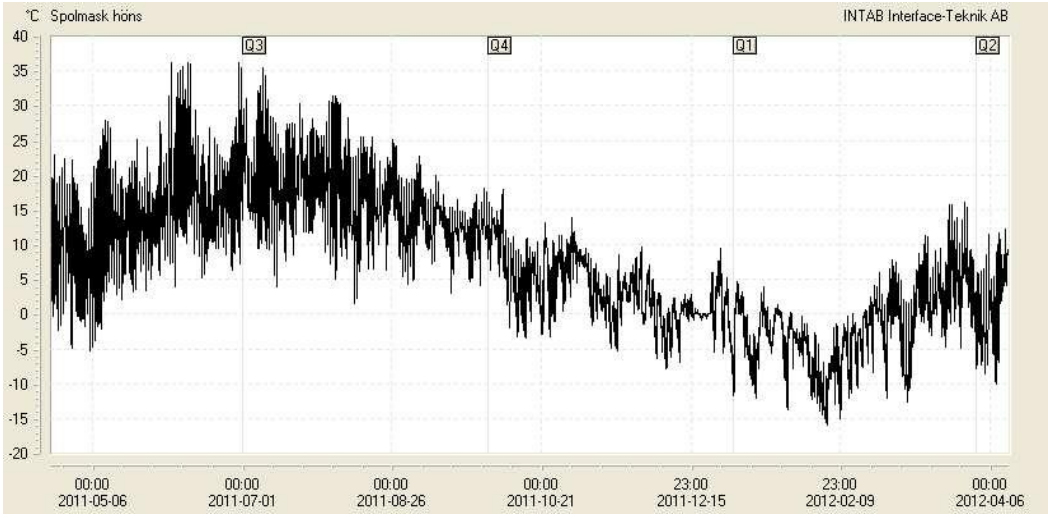
högre efter vårdepositionen. Det framgår även att antalet återfunna ägg i träckhögarna minskade drastikt från och med 30 veckor efter depositionen både under våren och hösten.

Undersökningen visar att spolmaskäggen sprids effektivt från de deponerade träckhögarna i utomhusmiljön. Träckhögar som deponerades under hösten bröts ned snabbare än de som deponerades under våren. Även om vi bara återfann en bråkdel av de ägg som deponerades på de olika ytorna går det inte att utesluta att de inte fanns kvar i miljön.

Figur 1.



Figur 2. Temperaturväxlingarna under uteförsöket



Delstudie 3: Under hösten 2011 påbörjades provtagningar i två ekologiska värphönsbesättningar i Mellansverige. Dessvärre var det på grund logistiska skäl (svårigheter att rekrytera lämliga flockar, och i vissa fall rådande väderförhållanden) svårt att samla in

proverna enligt den ursprungliga planen. Enligt våra observationer påträffades spolmaskägg före insättningen av hönsen i båda besättningarna. I den ena av besättningarna hittades desutom spolmaskägg på samtliga provtagningsplatser både inomhus (på sittpinnarna och i ströbädden) och utomhus (på verandan, utanför verandan, och längst bort i rastgården vid skydden). Antalet ägg var genomgående högst i proverna från sittpinnarna där proverna utgjordes av ren gödsel. Sammantaget visar delstudien dels att ett stort antal spolmaskägg finns både i inom- och utomhusmiljön, dels att de fanns kvar ägg trots sanering och betesvila mellan olika uppfödningsomgångar. Tillsammans med resultaten från delstudie 1 kan man dra slutsatsen att spolmasksmittan finns kvar trots betesvila och att smittan finns etablerad i djurens närmiljö, såväl inomhus som utomhus, inklusive i rastgården långt bort från hönshuset. En betydligt längre betesvila än de stipulerade två månaderna är nödvändigt för att bryta smittcykeln (se delstudie 2) och då finns fortfarande risken att infektiva ägg finns kvar inomhus.

Delstudie 4: Resultaten från de genetiska analyserna av tio spolmaskar från enskilda hönor och från lika många anläggningar, visade att den genetiska mångfalden var relativt likartad oavsett maskarnas ursprung (0,081–0,132). Även mätningen av populationsstrukturen (Fst = 0,130) tyder på förekomst av en relativt låg genetisk variation mellan spolmaskar från de olika isolaten. Även mutationshastighet hos de undersökta maskarna ($4N_u$ = 0,092) var relativt låg, liksom genflödet mellan de olika isolaten (N_m = 1,68).

Trots de små genetiska skillnaderna mellan maskar från olika isolat, var det möjligt att med 87 % sannolikhet identifiera från vilken anläggning som respektive spolmask kom ifrån. Den genetiska variationen hos de olika maskarna undersöktes även med så kallad nätverksanalys som visade att de enskilda spolmaskarna från respektive isolat grupperade i stort sett efter sitt ursprung. Enda undantaget var referensisolatet från Danmark.

Detta kan tolkas som att de svenska isolaten helt nyligen genomgått olika genetiska flaskhalsar till följd av att de sannolikt är relativt nyetablerade på de olika anläggningarna. Detta tyder på att smittan sannolikt har introducerats i låg dos vid ett eller ett fåtal tillfällen till respektive gård och därefter har parasiten förökats och genomgått en begränsad genetisk differentiering. Metoden utgör ett tänkbart smittspårningsverktyg, men ytterligare studier krävs i så fall för att det ska kunna appliceras i praktiken.

Delstudie 5: Pilotundersökningen påvisade en god effekt av avmaskningnsmedlet flubendazol genom att spolmaskägg, larver och adulta maskar i tarminnehållet eliminerades såväl under pågående avmaskning som direkt efter avslutad behandling. Två veckor efter avslutad avmaskning kunde parasitägg inte längre detekteras i tarminnehållet men äggutskiljning detekterades åter vid provtagning fem veckor efter avslutad avmaskning. Även förekomsten av spolmaskägg i de poolade proverna från gödselbanden minskade kraftigt i samband med avmaskningen men antalet gick aldrig ner till noll. De kontinuerliga fynden av spolmaskägg i

prov från gödselbanden kan sannolikt förklaras av att det finns en kraftig miljökontamination med parasitägg i hönshuset, inklusive på gödselbanden trots mekanisk rengöring kvällen före provtagning. Samlingsprover av träck från djurutrymmet är därmed sannolikt en otillförlitlig indikator för utvärdering av avmaskningseffekt i fältbesättningar, vilket är en mycket viktig observation att ta hänsyn till kontroll av avmaskning i fältbesättningar.

Larver i tarmslemhinnan (mukosan) detekterades inte under pågående avmaskning, men däremot redan en vecka efter avslutad avmaskning. Vuxna maskar fanns i tunntarmen före avmaskningen fram till och med den tredje behandlingsdagen. Därefter påträffades vuxna könsmogna parasiter på nytt fem veckor efter avslutad avmaskning. Flubendazol hade således full effekt mot samtliga stadier i tarmlumen och mukosan i den undersökta flocken. Effekten varade dock bara upp till mindre än en vecka efter avslutad behandling, och prepatenstiden (dvs tiden från infektion till förnyad äggutskiljning) var kortare än förväntat hos vuxna höns (≤5 veckor).

Tidsperioden för fynd av larver och adulta parasiter i hönornas tarminnehåll efter avslutad avmaskning, överensstämde med den förväntade nedre gränserna både för den histotropa fasen (två veckor) och spolmaskens hela livscykel (fyra till fem veckor). Enligt tidigare publicerad litteratur är den förväntade prepatenstiden dock betydligt längre hos vuxna hönor, cirka 8 veckor. Våra fynd visar samtidigt att effekten av avmaskningen var kortvarig (mindre än en vecka). Hönorna återinfekterades direkt efter slutförd avmaskning.

Sammanfattningsvis visar försöket att flubendazol är verksamt mot såväl vuxna *A. galli* som dess larvstadier i tarmlumen och mukosan men effekten är kortvarig. Ytterligare studier behövs således för att optimera avmaskningsprogram för värphöns.

Referenser

Jansson, D.S., Vågsholm, I., Nyman, A., Christensson, D., Göransson, M., Fossum, O. & Höglund, J. 2010. Prevalence of ascarid infections in commercial laying hens in different housing systems. *Avian Pathology* 39, 525–532.

Höglund J. & Jansson D.S., 2011. Infection dynamics of *Ascaridia galli* in non-caged laying hens. *Veterinary Parasitology* 180, 267–273.

Muntliga presentationer

Tarbiat, B. 2012. Environmental tolerance of the free-living stages of the poultry roundworm (*Ascaridia galli*). Muntlig redovisning av master's thesis, SLU.

Höglund, J. 2012. Forskningspresentation: Spolmask hos värphöns. Projektrådsmöte för fjäderfänäringen, Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA), Uppsala, 5 oktober.

Höglund, J. & Jansson, D.S. 2012. *Ascaridia galli*–current research activities in Sweden. 1st International *Workshop on Ascaridia galli*, Hørsholm, 1–2 februari. http://ascaridiagalli.eu/Workshops/FirstInternationalWorkshop12Feb2012.aspx

Jansson, D.S. 2012. Parasiter i ekologiska fjäderfäbesättningar. EPOK-seminarium, SLU, 20-21 november, Skara. http://www.slu.se/sv/centrumbildningar-och-projekt/epok-centrum-for-ekologisk-produktion-och-konsumtion/epok/seminariedokumentation1/det-ar-inne-att-vara-ute/

Jansson, D.S. & Höglund, J. 2013. Efficacy of flubendazole against *Ascaridia galli* in laying hens. Nordic Poultry Conference, Helsinki, Finland 6–8 November, 2013.

Nylund, M. 2013. Effekten av flubendazol mot *Ascaridia galli* hos värphöns. Muntlig redovisning 22 april av examensarbete inom veterinärprogrammet, SLU. 2013:76.

Internationella konferensrapporter

Jansson, D.S., Morrison, D., Engström, A., Nejsum, P. & Höglund, J. 2011. Assessment of genetic relationships among *Ascaridia galli* from different laying hen farms with AFLP markers. *XVII Congress of World Veterinary Poultry Association (WVPA*), pp. 586–588. 14–18 August, Cancún, México.

Rapporter och publikationer

Höglund J., Morrison D.A., Engström A., Nejsum P., Jansson D.S. 2012. Population genetic structure of *Ascaridia galli* re-emerging in non-caged laying hens. *Parasite and Vectors*, 5, 97-99.

Nylund M. 2013. Effekten av flubendazol mot *Ascaridia galli* hos värphöns. Examensarbete inom veterinärprogrammet. 2013:76. 24 pp. http://stud.epsilon.slu.se/6256/

Tarbiat B. Environmental tolerance of the free-living stages of the poultry roundworm (*Ascaridia galli*). Självständigt arebete inom veterinärmedicin. EX0715. 44 pp. http://stud.epsilon.slu.se/4764/

Tarbiat B., Jansson D.S., Höglund J. Environmental tolerance of free-living stages of the poultry roundworm *Ascaridia galli.* Manuskript inskickat för publicering. *Parasitology.*

Kommande publikationer

En förkortad verision av denna rapport kommer att publiceras populärvetenskapligt i branschtidningen *Fjäderfä*.

Delstudie 5 kommer att sammanställas under 2014 för vetenskaplig publicering en granskad tidskrift.