

Årsrapport 2019 för det av SLU EkoForsk finansierade projektet:

Parasitövervakning i ekologiska fårbesättningar

Projektansvarig: Johan Höglund, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BFV), SLU.

Medsökande: Katarina Gustafsson, Gård & Djurhälsan, Långhem.

Bakgrund

Kännetecknande för svensk ekologisk lammproduktion är höga krav på djurskydd och en låg användning av läkemedel inkluderande anthelmintika. Samtidigt är det känt att det är svårt att bedriva betesbaserad ekologisk lammproduktion utan att avmaska djuren över huvud taget. Erfarenheter från svenska fårgårdar visar att angrepp med mag- och tarmparasiter är vanligt förekommande och att det bland dessa finns vissa arter som kan orsaka allvarliga sjukdomar som inte kan kontrolleras på annat vis. Det finns ett stort antal olika arter maskar hos får. Bland dessa kan särskilt den blodsugande stora löpmagsmasken (*Haemonchus contortus*) ställa till med allvarliga problem särskilt hos växande lamm men även hos till exempel högdräktiga tackor.

Det långsiktiga målet med projektet är att föreslå och utvärdera en riskbaserad metod för övervakning och kontroll av fårparasiter i ekologiska besättningar. Metoden bygger på att all användning av avmaskningsmedel ska föregås av parasitundersökning. Detta tillvägagångssätt accepteras bland annat enligt KRAVs regelverk för ekologisk produktion i Sverige. Även om det sedan några år finns nya riktlinjer utfärdade av Gård & Djurhälsan för hur träckprover skall insamlas och analyseras i större besättningar med fler än 60 tackor, har dessa aldrig tidigare utvärderats. Förhoppningen är att resultaten från projektet på sikt skall bidra till utvecklingen av ett evidensbaserat och kostnadseffektivt övervakningsprogram.

Projektaktiviteter 2018-2019

Under projektets andra år har vi sålunda samlat data från 19 ekologiska fårbesättningar med mellan 72 och 210 tackor fördelade över Sverige. Träckprover från cirka 10% av djuren i respektive besättning har insamlats vid två tillfällen (med två undantag); i) först provtogs tackorna i anslutning till betesläpp på våren, och ii) därefter togs ett uppföljande prov från lammen när de hade varit på bete under minst 6 veckor. Gårdarna rekryterades slumpmässigt med hjälp av Gård & Djurhälsans medlemsregister. Inklusionskriterierna var; i) besättningar med ≥ 70 lammande tackor ii) ingen avmaskning inom sex månader före första provtagningen. På detta sätt rekryterades sammanlagt 19 större fårgårdar från tre regioner i Sverige: Götaland (n = 13), Svealand (n = 4) och Norrland (n = 2).

Individuella träckprover från djuren i de olika besättningarna placerades vid respektive provtagningstillfälle i lufttäta blixtlåspåsar där luften pressades ut innan de förseglades. Proverna skickades därefter med post till diagnostiklaboratoriet (Vidilab AB). Efter ankomst lagrades proverna vid 4 °C under högst ett dygn innan analys. I laboratoriet tillverkades

mellan tre och fyra tripletter per gård och provtagningstillfälle genom noggrann blandning av 3 g avföring från tre djur vardera. Resterande träck placerades i frys för DNA analys.

Äggräkning utfördes på alla tripletter med McMaster-teknik och med en minsta diagnostisk känslighet av 50 maskäggs per gram avföring (EPG). Vid avläsningen delades svaren in i antalet trichostrongylida ägg – exklusive ägg från *Chabertia / Oesophagostomum*, *Nematodirus* spp. som räknades separat. Även andelen *H. contortus* ägg bestämdes baserat på deras karakteristiska form, mörkbruna blastomerer och dimensioner (medellängd = 70 ± 10 μm och bredd, med = 45 ± 5 μm) samt *Trichostrongylus axei* enligt Ljungström et al. (2018).

Därutöver extraherades DNA efter tining från samma träckprover som alltså tidigare blivit undersökta med traditionell parasitologisk metodik. På motsvarande sätt som vid den mikroskopiska analysen kommer samtliga tripletter att även undersökas med PCR baserad diagnostik. Till dags dato har sammanlagt 1 g träck från respektive tripplett placerats i 7 ml vävnadshomogeniserande rör (CK28, Precellys© Lysing kit) med 4 ml InbititEx-buffert och 3,5 g (0,5 mm Zirconia / Silica beads, Techtum). Proverna homogeniserades på ett Precellys© Evolution-instrument (Bertin Technologies) under 5 cykler (30 sek / 30 s) vid 650 rpm. Därefter centrifugerades rören vid 1500 rpm i 5 min vid rumstemperatur på en IEC CL30 centrifug (Thermo Scientific), från vilken 1,2 ml av lysatet aspirerades i ett 2 ml mikrocentrifug (Eppendorf) som därefter kan förvaras vid -20°C . Genomiskt DNA extraherades med hjälp av QIAamp DNA-stoolkit (Qiagen) enligt tillverkarens instruktion och förvarades i frys till kommande undersökning (se nedan).

De gårdarna som deltog i studien har även blivit ombudda att fylla i ett webbaserat frågeformulär (Netigate I). Enkäten innehåller 15 obligatoriska frågor om gårdens struktur och skötselrutiner samt ytterligare 32 slutna eller öppna frågor om de avmaskningsrutiner som tillämpas på gården.

Resultat

Får från 19 ekologiska gårdar deltog i studien. Vid sammanlagt 36 provtagningstillfällen insamlades 393 individuella träckprover som blandades i 131 tripletter och undersöktes genom McMaster räkning. Proverna från tackorna (N=19) anlände under april och maj och de från lammen (N=17) från juni till september 2018. Antalet tackor varierade mellan 72 och 250 djur med ett medelvärde av $115 \pm \text{SD } 42$. De flesta gårdar utom två (O2 och O8) lämnade prov både från sina tackor och lamm. I tabell 1 redovisas fynden från samtliga parasitologiska undersökningar baserade på mikroskopi.

Tabell 1. Äggutskiljningen hos ekologiska fårbesättningar med 72-250 tackor. Samtliga prover undersöktes med McMaster-teknik. N=antal provtagningstillfällen.

Parasiter	Ekologiska gårdar		
	Positiva prover	Prevalens	95% CI
Tackor	N=19		
<i>Trichostrongylida</i> ägg	18	95%	10%
<i>Haemonchus contortus</i>	8	42%	22%
<i>Trichostrongylus axei</i>	2	11%	14%
<i>Chabertia/Oesophagostomum</i>	13	68%	21%
<i>Nematodirus filicollis</i>	2	11%	14%
<i>Nematodirus spathiger</i>	0	0%	
<i>Nematodirus battus</i>	0	0%	
<i>Moniezia expansa</i>	3	16%	16%
Koccidier (oocystor)	1	5%	10%
Lamm	N=17		
<i>Trichostrongylida</i> ägg	16	94%	12%
<i>Haemonchus contortus</i>	4	24%	20%
<i>Trichostrongylus axei</i>	3	18%	18%
<i>Chabertia/Oesophagostomum</i>	10	59%	23%
<i>Nematodirus filicollis</i>	7	41%	23%
<i>Nematodirus spathiger</i>	1	6%	11%
<i>Nematodirus battus</i>	2	12%	15%
<i>Moniezia expansa</i>	11	65%	23%
Koccidier (oocystor)	8	47%	24%

Fortsatta undersökningar

Målsättningen med det kommande årets projektaktiviteter är att utvärdera en ny PCR baserad diagnostik för detektion av stora löpmagsmasken *Haemonchus contortus*, som bygger på analys av träckprover som insamlas från cirka 10% av djuren i flocken (det vill säga samma prover som hittills blivit analyserade med McMaster). I skrivande stund screenas samtliga prover med avseende på mängden mask-DNA. Detta kommer att undersökas med tre olika primer-probe par riktade mot olika regioner i maskarna ITS2 gen. De regioner som undersöks är antalet kopior av; i) universellt strongylid-DNA, ii) *Haemonchus*-specifikt DNA och iii) *Teladorsagia*-specifikt DNA med droplet digital (dd)PCR teknik (BioRad®) enligt Elmahrawy et al. (2018). Med denna ddPCR-duplexanalys kan det totala antalet genkopior av respektive släkte kvantifieras i förhållande till den totala mängden strongylid-DNA i provet genom att dividera ITS2-kopiorna för respektive släkte med det totala antalet ITS2-kopior detekterade med universalproben. Även resultaten från enkätundersökningen kommer att

bearbetas under det kommande året. Därefter är målsättningen är att sammanställa och utvärdera samtliga resultat för publicering i en internationell tidskrift med peer-review samt att kommunicera fynden populärvetenskapligt.

Referenser

- Elmahalawy, S.T., Halvarsson, P., Skarin, M., Höglund, J. 2018. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) as a novel method for absolute quantification of major gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet. Parasitol.*, 261, 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.07.008>
- Ljungström, S., Melville, L., Skuce, P.J., Höglund, J., 2018. Comparison of four diagnostic methods for detection and relative quantification of *Haemonchus contortus* eggs in feces samples. *Front. Vet. Sci.* 4, 239. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00239>.