

2011-01-19

Slutrapport: Spolmask i svenska värphönsbesättningar – kartläggning av parasitens infektionsförlopp och en populationsgenetisk studie

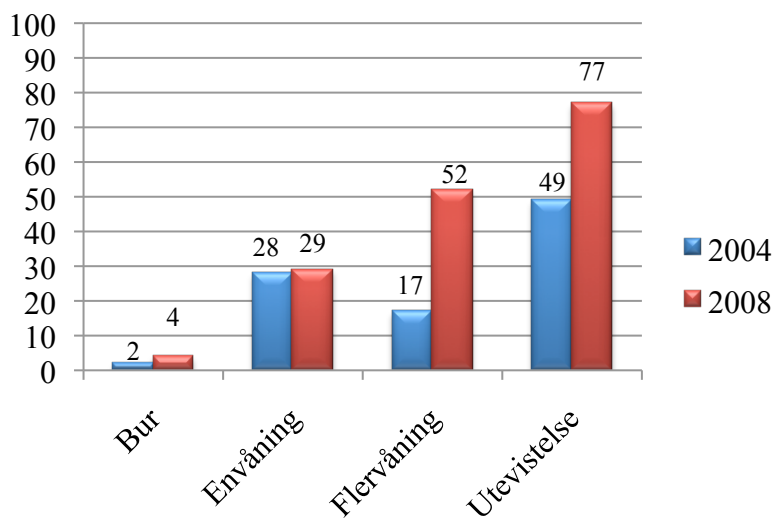
Johan Höglund, professor¹⁾ och Désirée Jansson, DVM, tf statsveterinär²⁾

1) Institutionen för Biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU)

2) Enheten för Djurhälsa och Antibiotikafrågor, Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA)

Bakgrund

Under 2000-talet har förekomsten av rundmaskar, ffa spolmasken *Ascaridia galli*, ökat dramatiskt bland kommersiella värphöns i Sverige från att tidigare ha varit en mycket ovanlig infektion (under många år) (Fig. 1). Ökningen är kopplad till omställningen av svensk äggproduktion genom att frigående höns inom- och utomhus exponeras för träck och träckburna smittämnen i högre grad än höns som hålls i bur.



Figur 1. Förekomst (%) av rundmaskägg (*A. galli* och *H. gallinarum*) i svenska värphönsbesättningar 2004 och 2008 på gårdsnivå. I studien deltog ca 2/3 av samtliga kommersiella värphönsbesättningar i Sverige (35-72 besättningar per inhysningssystem och år). I kategorin utevistelse ingår ekologiska värphöns (KRAV-certifierade) och enstaka konventionella besättningar med utevistelse. Undersökning 2004 visade att 70 % av de infekterade flockarna hade spolmask. Källa: Jansson *et al.*, 2010, *Avian Pathology*.

Spolmaskens inverkan på värdjuret styrs framförallt av parasitbördan (antalet maskar i tarmen). Vid lindrig infektion är inverkan på värden liten, medan kraftig infektion leder till nedsatt djurhälsa och produktionsförluster såsom avmagring, dålig tillväxt, ökad foderkonsumtion, sänkt äggproduktion, diarré, beteendeförändringar och ökad dödlighet till följd av tarmobstruktion (maskförstoppning) och samverkan med bakterier. Dessutom kan spolmaskar påträffas i konsumtionsägg vilket utgör ett hot mot konsumentförtroendet. Parasitbördan styrs av en rad olika samverkande faktorer hos både värdjuret och parasiten, såsom värdjurets ålder, immunitet, hälsotillstånd, infektionsdos, belägningsgrad, genetiska faktorer (hybrid), och livslängden hos parasiten. I projekt som redovisas i denna rapport har vi undersökt infektionsförloppet i 6 svenska frigående värphönsflockar.

Syften

- 1) Ta reda på om svenska värphöns smittas av spolmask från kvarvarande parasitäggs från föregående flock eller genom att unghönsen är infekterade vid leverans.
- 2) Undersöka hur spolmaskinfektionen utvecklas under en produktionsomgång.
- 3) Undersöka effekterna av desinfektion före insättning och avmaskning.
- 4) Ta reda på genetiskt släktskap mellan maskar insamlade från olika anläggningar.

Deltagande gårdar och flockar

I huvudprojektet ingick 3 ekologiska och 3 konventionella kommersiella värphönsflockar (Tabell 1) från olika gårdar där föregående flock i samma djurutrymme var infekterad med spolmask. På samtliga gårdar fanns minst 2 värphönsflockar, och på 5/6 gårdar fanns minst 2 olika ålderskategorier. Unghönsen kom från 2 olika uppfödare (2 flockar vardera, olika unghönsflockar) eller var uppfödda av äggproducenten (2 flockar). Hönsen sattes in i maj-augusti, 2009 vid 14-16 v ålder. Flockstorleken varierade mellan 1000-10 000 höns. Fem flockar hade kutterspån som strömedel från insättningen, medan strö inte användes i en flock. Fem flockar hade tillgång till hela djurutrymmet direkt efter insättning, och en flock släpptes ner på golvet 4 veckor efter insättning.

Tabell 1

Gård/flock	Ekologiska (A-C)			Konventionella (D-F)		
	A	B	C	D	E	F
Inhysning	Flervåning	Flervåning	Flervåning	Envåning	Envåning	Flervåning
Hybrid	Hy-Line W-98	Bovans Robust	LSL	Bovans Robust	Hy-Line W-98	Hy-Line W-98
Ströbädd, hantering	Extra strö vid behov	Ingen åtgärd	Byte 3 ggr	Ingen åtgärd	Byte 3 ggr	Extra strö vid behov
Utgödsling	Gödselmatta	Gödselmatta	Gödselmatta	Gödselskrapa	Nej	Gödselmatta
Sanering mellan flockar	Högtryck	Högtryck	Högtryck	Högtryck	Högtryck / ångtvätt	Ångtvätt
Temperatur, tvätt (°C)	50-60	60	80	60	60-70 / 120	50-60
Desinfektion	Virkon® S	Interkokask® RTU+TEK-TROL®	Nej	Interkokask® RTU+TEK-TROL®	Nej	Interkokask® RTU+ Rodasept®

Projektet genomfördes under normal drift, dvs producenten och vid behov i samråd med besättningens veterinär, fattade alla beslut om skötsel, avmaskning mm. Före insättning av flockarna B, D och F desinfekterades djurutrymmet med klorokresol (Interkokask® RTU) som har dokumenterad effekt mot tarmmaskäggs (skadar parasitäggsens skal). Flock B, E och F avmaskades med flubendazol

(Verminator[®]) i drickvattnet. Flock B avmaskades i 5 dagar 40 veckor efter insättning, och flockarna E och F avmaskade i 6-7 dagar 22 och 46 respektive 26 och 41 veckor efter insättning.

Provtagning och analyser

Träckprovtagning för analys av antalet parasitägg (ägg per gram träck, epg) gjordes ca 1 vecka efter insättning för att kontrollera hörnornas parasitstatus vid ankomst, och därefter 4, 6, 8, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 and 50 veckor efter insättning. Provtagningen utfördes av djurägare/djurskötare enligt skriftlig instruktion (4 samlingsprov à 100 g färsk träck samlades från inredningen eller gödselmattor, gödselskrapa/skruv, på och under bingen). Provtagningsmetodiken är utarbetad i ett tidigare projekt vid SVA. Proverna analyserades dock i detta projekt med en lägre detektionsgräns på 20 epg (rutinmässigt används 50 epg).

Vid 3 tillfällen (15-20, 33-40 och 50-53 veckor efter insättningen) undersöktes tarmar från 5 friska avlivade höns för att fastställa parasitbördan. Parasiterna artbestämdes och räknades. Dessutom undersöktes tarmar från ytterligare 60 värphöns från flock E och F före (10 höns) och direkt efter avmaskning (20 höns) för att undersöka effekten av avmaskning.

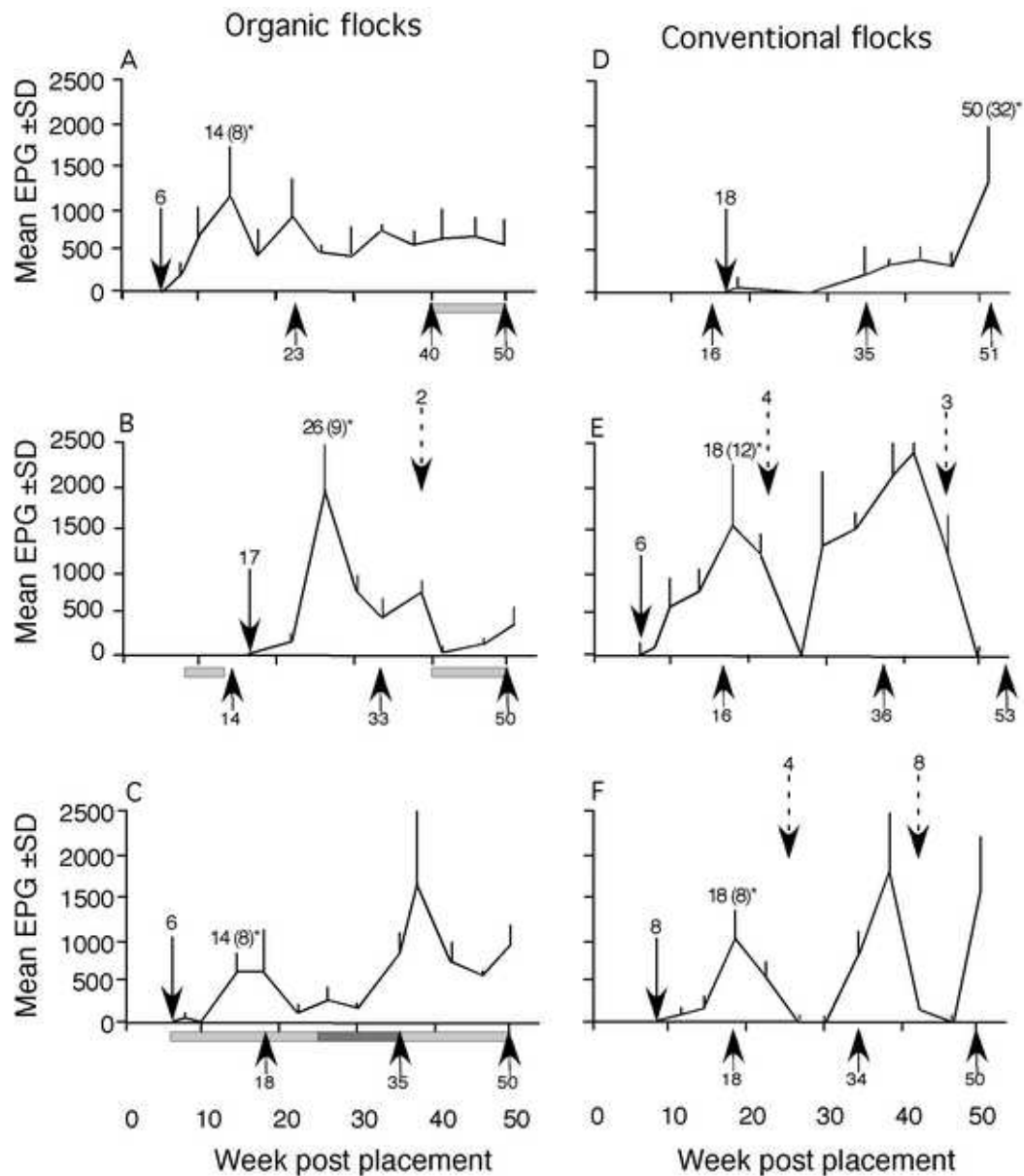
Temperatur och relativ luftfuktighet mättes var 30:e minut under de första 50 veckorna efter insättning genom automatiska registreringar med dataloggers som monterades ca 0,5 m ovanför inredningen mitt i huset. I ett fall sattes dataloggern 2 meter ovanför ströbädden (flock E), och på en gård (B) sattes 2 dataloggers upp i 2 separata avdelningar i samma hus.

Resultat

Träckprov (antal parasitägg)

Alla provtagningar utom 1 (30 v, flock D) genomfördes enligt plan. Antalet parasitägg (medelvärde för de 4 proverna vid varje provtillfälle) i de 6 flockarna visas i Figur 2. I 4 av flockarna (A, C, E och F) påvisades de första parasitäggen 6-8 veckor efter insättning. I flock B och D dröjde det 17-18 veckor efter insättning innan de första parasitäggen påvisades. Maximal äggutskiljning (i medelantal 605-1525 per gram träck beroende på flock) inträffade 8-12 veckor efter att de första parasitäggen hade påvisats, utom i flock D där äggutskiljningen ökade långsamt om nådde max-värden först 32 veckor efter att de första parasitäggen hade påvisats (medelantal 1310 epg). Högst antal parasitägg i ett enskilt prov sågs i ett prov från flock C i februari 2010, 38 v efter insättning (4600 epg). Högsta medelantal parasitägg utskiljdes av flock E och F, därefter kom flockarna B och C, och lägst antal utskiljdes av flockarna A och D. Samtliga flockar förblev infekterade under hela provtagningsperioden, utom tillfälligt efter avmaskning i flock B, E och F. Efter avmaskning påvisades parasitägg i de flesta fallen redan efter 2-4 veckor, och i 2/3 flockar (E och F) var antalet utskiljda parasitägg högre 8-10 veckor efter den första avmaskningen jämfört med före avmaskning. Statistisk analys visade signifikant skillnad i äggutskiljning ($P < 0.0001$) mellan flockarna och olika

provtagningstillfällena, men ingen skillnad beroende på om flockarna var konventionella eller ekologiska ($P=0.534$).

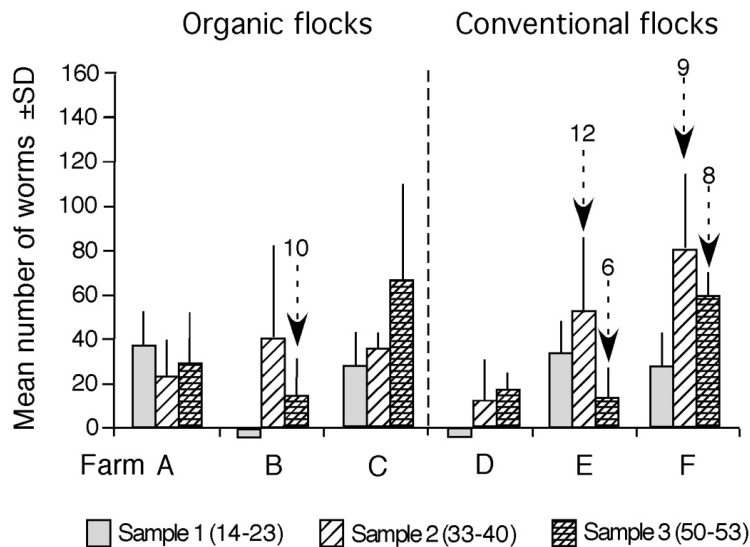


Figur 1. Medelantal rundmaskägg (epg) under de första 50 veckorna efter insättning (weeks post placement) i flock A-F. Heldragna pilar ovanför x-axeln visar när parasitägg först påvisades (veckor efter insättning), och streckade pilar visar när flocken avmaskades (flock B, E och F). Siffran vid denna pil visar efter hur många veckor parasitägg åter påvisades. Siffrorna vid (*) visar när maximal äggutskiljning inträffade (veckor efter insättning), och siffran inom parentes när detta inträffar i relation till när de första parasitäggen påvisades. Pilarna under x-axeln visar när prov togs för tarmundersökning. De ljusgrå stolparna under diagrammen visar när de ekologiska flockarna hade tillgång till rastgårdar och mörkgrå stolpar visar tillgång till veranda. Källa: Höglund och Jansson (inskickat manuskript).

Maskbörda och effekt av avmaskning

I medeltal 10-80 spolmaskar påvisades i tarminnehållet per höna i de olika flockarna (Figur 3). I flock C påvisades även blindtarmsmask (*H. gallinarum*). Antalet spolmaskar ökade generellt när hönsen blev äldre oavsett om flocken avmaskades eller ej. Statistisk analys avslöjade signifikanta skillnader

mellan olika flockar ($P=0.0003$), mellan olika provtagningstillfällen ($P=0.001$), men inte beroende på om flockarna var konventionella eller ekologiska ($P=0.061$). Vid undersökning 6-12 veckor efter avmaskning fanns åter äggproducerande spolmaskar i tarminnehållet, trots att inga överlevande maskar kunde påvisas direkt efter avmaskning i flockarna E och F.



Figur 2. Medelantal spolmaskar i tarmen hos 5 hönor vid 3 olika tillfällen under flockarnas liv (provtagningstillfällen visas i Figur 1). De streckade pilarna med siffror anger vilka provtagningar som föregåtts av avmaskning och hur många veckor som gått sedan avmaskningen. Källa: Höglund och Jansson (inskickat manuskript).

Övriga resultat

Att gödsla ut ströbädden (flock C och E) eller lägga in mer strö under omgången (flock A och F) hade till synes ingen effekt på spolmasksmittans utveckling i flockarna.

Miljödata

Medeltemperaturen under hönsomgången i de olika djurutrymmena (0-50 v efter insättning) varierande mellan 17,5 °C och 20,4 °C, med dagliga fluktuationer på ca 15 °C, särskilt under sommar och vintersäsongen. Lägsta uppmätta temperatur vid golvet var 4 °C (flock B) och högsta var 32,8 °C (flock A). Temperaturen var i princip konstant i höns huset för flock E där loggern placerades 2 m ovanför ströbädden (min 16,7 °C, max 28,3 °C). Den relativa fuktigheten varierade på samma sätt (medel 65,7-72,8 %), med störst fluktuationer under dygnet (30-90 %) under sommaren.

Smittspårning

För att ta reda på grad av genetiskt släktskap mellan spolmaskar från tamhöns på olika svenska anläggningar undersöktes ett stort antal spolmaskar med en PCR-baserad genetisk fingerprinting-metod som förkortas AFLP (amplified restriction fragment length polymorphism). Vid analys med AFLP-teknik används i ett första steg olika restriktionsenzymer som klipper sönder det genomiska DNAt i mindre fragment och som därmed får specifika ändrar som sammanfogas med sk adaptrar, dvs

ett kort genfragment med en känd nuklotidsekvens. Genom att använda olika sk primer par som är komplementära till adaptorsekvensen plus ett antal nukleotider i det sammanfogade genfragmentet är det möjligt att styra vilka genfragment som ska visualiseras.

De spolmaskar som vi analyserade kom från värphöns och i ett fall från slaktkycklingföräldrar. Maskarna från värphönsen insamlades i huvudsak i samband med slaktbesiktning vid ett värphönsslakteri (Svenskt Fågelkött AB i Håkantorp), medan det övriga materialet insamlades vid SVAs rutinobduktioner. Dessutom ingick ett referensmaterial som skickades från Danmark och som i kom från en experimentell studie. Från de allra flesta anläggningarna insamlades endast 10 spolmaskar från enskilda hönor (Tab 2). 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 anläggning var att ta reda på om det genetiska uttrycket skiljde sig mellan maskar från olika fåglar men som vistats i samma anläggning.

Tabell 2

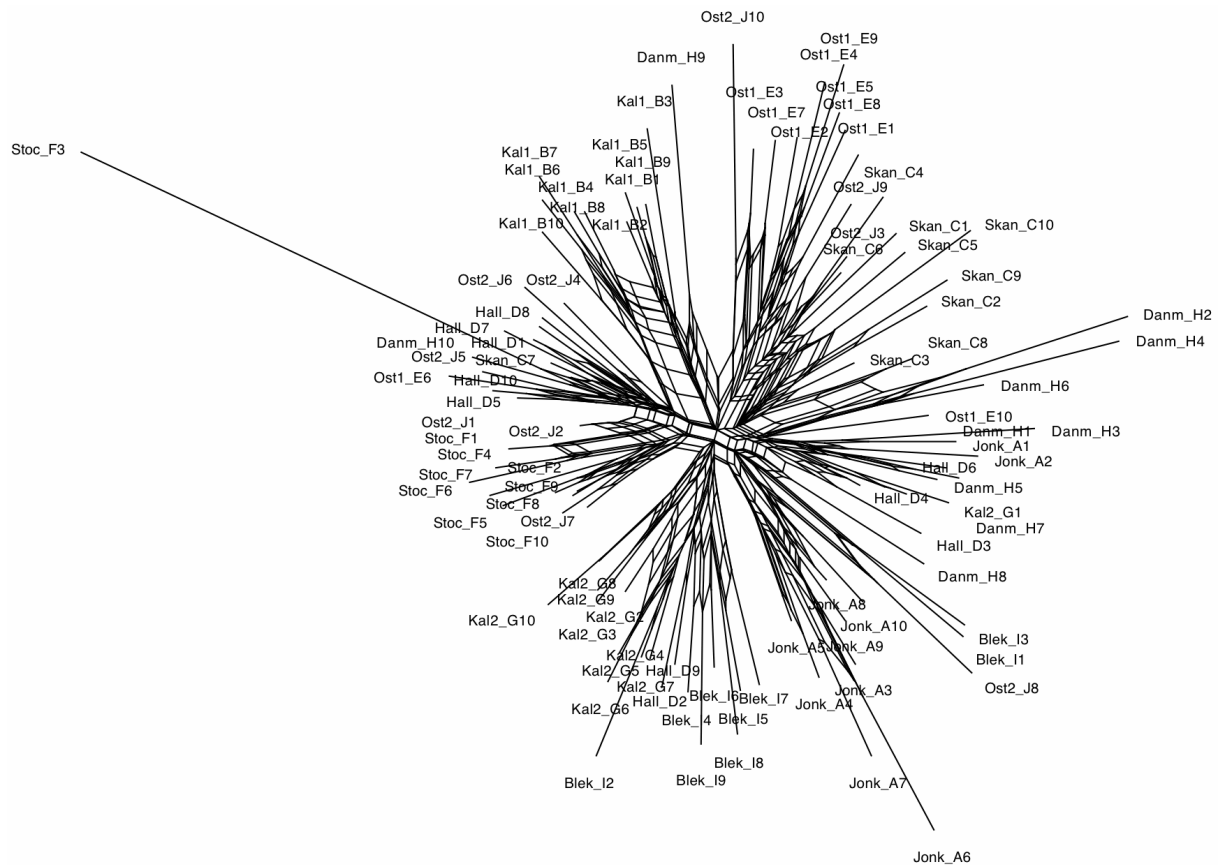
Provdatum	Kategori	Inhysning	Län/Land	Kod	Höns	Maskar
09-05-19	Värphöns	Flervåning	Jönköping	Jonk	6	60
09-06-08	Värphöns	Flervåning	Kalmar	Kal1	1	10
09-06-16	Slaktkycklingföräldrar	Frigående inne	Skåne	Skan	6	34
09-06-25	Värphöns	Flervåning	Halland	Hall	1	10
09-07-04	Värphöns	Flervåning	Östergötland	Ost1	1	10
09-07-06	Värphöns	Envåning	Stockholm	Stoc	1	10
09-07-29	Värphöns	Envåning	Kalmar	Kal2	1	10
09-08-11	Försöksdjur	Okänt	Danmark	Danm	10	20
09-08-21	Värphöns	Frigående ute	Blekinge	Blek	1	10
09-08-25	Värphöns	Ekologisk	Östergötland	Ost2	1	10

Genetiskt släktskapsanalys

Med AFLP-tekniken detekteras olika genfragment efter storlek (längd). Storleken hos de olika fragmenten visualiseras som olika toppar i ett diagram och där topphöjden ger ett mått på antalet fragment av en viss storlek. Vid tolkningen måste man följaktligen fatta beslut om vilket gränsvärde som skall gälla för att erkänna närvaro eller frånvaro av olika genfragment. I denna studie utvärderades tre detektionsnivåer (50, 80 och 100) för varje enskilt prov, varefter vi drog slutsatsen att gränsvärdet 80 gav ett konsekvent resultat, medan 50 som gränsvärde producerade för mycket bakgrundsbrus och 100 avvisade för mycket informativ data. Följaktligen användes 80-nivån som gränsvärde vid alla övriga analyser.

Analysen av 60 spolmaskarna från de sex hönorna från samma gård (Jonk), gav mycket likartade nivåer och mönster för genetisk mångfald, oavsett från vilken höna som proverna hade insamlats från. Detta indikerar att de spolmaskar som insamlades från olika hönor var närbesläktade med varandra när fåglarna hade vistats i samma anläggning. Detta innebär att det sannolikt inte spelade någon roll för smittspårningen att proverna i de allra flesta fall endast hade tagits från en höna per anläggning.

Resultaten från analysen av tio spolmaskar från enskilda hönor från lika många anläggningar, visade att den genetiska mångfalden var relativt likartad oavsett maskarnas ursprung ($F_{st} = 0,081-0,132$). 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.



Figur 3. Nätverksanalys baserad på AFLP-fragment data från 10 spolmaskar från 10 anläggningar. Varje gren representerar en enskild mask där första delen av namnet representerar den anläggning som masken insamlades från (se tabell 3).

Trots små genetiska skillnader mellan maskar från olika anläggningar var det en 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, vilken illustreras i figur 3 och som visar att de enskilda spolmaskarna från varje anläggning är i stort grupperade efter ursprung, även om vissa maskar ibland är genetiskt sett helt olika från övriga maskar inom samma grupp (exempelvis mask Ost1_E10 grupperade inte med de andra maskar från samma anläggning).

Ny kunskap och slutsatser

- Det fanns ingen tydlig skillnad mellan de konventionella och ekologiska flockarna som ingick i projektet avseende antalet parasitägg som utskiljdes med träcken, antalet spolmaskar som finns i tarmen (parasitbörda), eller hur infektionen utvecklades i flockarna. Däremot skiljde sig resultaten åt mellan olika flockar. Infektionsförloppet i en hönsflock påverkas av flera sam- och motverkande faktorer och kan variera avsevärt mellan olika flockar.
- Flockarna som ingick i projektet smittades med stor sannolikhet efter leverans genom kvarvarande ägg från en tidigare hönsomgång. Denna slutsats baseras på att de första parasitäggen påvisades efter att parasiten hade hunnit fullborda sin livscykel (vilket tar minst 4-6 veckor).
- Sanering och desinfektion ledde inte till att smittan eliminerades från höns husen, däremot försenades smittillfället i 2 av 3 flockar i hus som desinfekterats med klorokreosol (Interkokask[®]RTU). Flock B kan ha smittats av äldre höns utomhus (höns från olika flockar med olika ålder var ej åtskilda utomhus på denna gård).
- Avmaskning med flubendazol (Verminator[®]) avdödade alla parasiter i tarmlumen (inuti själva tarmen), men effekten var mycket kortvarig. Parasitägg påvisades redan inom 2-4 veckor efter avmaskning, vilket tyder på en sämre effekt mot omogna larvstadier i tarmens slemhinna.
- Efter en tid tycks hönorna utveckla en viss immunitet (motståndskraft) mot spolmasken, vilket gör att antalet parasitägg sjunker i träcken. Våra resultat tyder dock på att avmaskning med flubendazol tycks störa denna immunitetsutveckling och i själva verket bidra till en högre parasitbörda med ökad parasitäggutskiljning efter avmaskning jämfört med före.
- Resultaten från smittspårningen indikerade att spolmaskar från olika anläggningar uppvisar sådan grad av genetisk struktur som tyder på att de varit isolerade från varandra under tillräckligt lång tid för att betraktas som genetiskt separerade isolat. Detta stödjer idén om att värphönsen i den första delstudien med största sannolikhet smittades av en kvardröjande stationär smitta efter ankomst till uppfödninganläggningen.

Framtida forskningsbehov

- Mer kunskap behövs om effekterna av rengöring och desinfektion för att ytterligare bekräfta om dessa åtgärder kan minska det kvardröjande smittrycket och användas praktiskt.
- Den avmaskningsstrategi som tillämpas i dagsläget i Sverige har mycket kortvarig effekt och förhindrar inte att höns huset och rastgårdar kontamineras med stora mängder parasitägg. Avmaskningsstrategin behöver optimeras och för detta krävs mer kunskap.

- Användning av avmaskningsmedel till värphöns behöver analyseras ur ett hållbarhetsperspektiv. Resultat från besläktade parasiter hos andra djurslag visar att det kan finnas risk för resistensutveckling mot flubendazol hos hönans spolmask. Detta vore mycket olyckligt med tanke på att det för närvarande bara finns ett avmaskningsmedel tillgängligt. Ytterligare forskning behövs för att bedöma risken och för att förhindra denna utveckling.
- Ytterligare analyser krävs för att fastställa om avmaskningsmedlet flubendazol har effekt även mot spolmaskens larver som utvecklas i tarmväggens slemhinna.
- Kunskapen om parasitens yttre stadier i miljön är begränsad. Sådan kunskap skulle kunna bidra till att minska smittrycket i hönsflockar. I ekologiska besättningar krävs det dessutom ökad kunskap om den relativa betydelsen vad gäller rastgårdens betydelse jämfört med den smittspridning som sker inomhus.
- Fortsatta genetiska studier skulle kunna avslöja förekomst och spridning av mutationer hos tamhönsens spolmask och som har visat sig vara sammankopplade med läkemedelsresistens (anthelmintikaresistens) hos andra närbesläktade nematoder.

Rapportering

Resultat från projektet har redovisats vid 2 tillfällen för representanter/aktörer inom fjäderfäringen. Dels för medlemmar i Stiftelsen Veterinär Fjäderfäforskning vid Projektrådsmöte fjäderfä vid SVA i augusti 2010, dels i november 2010 i samband med Svenska Äggs kontaktdagar i Växsjö. Ett manus är sammanställt och skickades i december, 2010 för publicering till en granskad vetenskaplig tidskrift .

Erkännanden

Vi vill rikta ett varmt tack till djurägarna som deltog i projektet liksom till forskningsingenjör Annie Engström, BMA Daniel Martinsson och biostatistiker David Morrison som har hjälpt till med den populationsgenetiska undersökningen.