



*Sveriges lantbruksuniversitet*

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

# Effekten av flubendazol mot *Ascaridia galli* hos värphöns

Mikael Nylund

*Uppsala*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697*

*Examensarbete 2013:76*



SLU

*Sveriges lantbruksuniversitet*

Efficacy of flubendazole against *Ascaridia galli* in  
commercial laying hens

Effekten av flubendazol mot *Ascaridia galli* hos värphöns

Mikael Nylund

*Handledare: Johan Höglund, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap och biträdande handledare Désirée Jansson, Statens veterinärmedicinska anstalt*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013*

*Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap*

*Institutionen för BVF*

*Kurskod: EX0751, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: Ascaridia galli, agar-gel-inkubation, behandlingseffekt, flubendazol, histotropa larver, värphöns*

*Key words: Ascaridia galli, agar-gel incubation, treatment efficacy, flubendazole, histotrophic larvae, laying hens*



## INNEHÅLL

Sammanfattning .....	7
Summary .....	9
Inledning.....	11
Material & metoder .....	12
Urval och flockdata .....	12
Provtagning på gården.....	12
Laboratorieanalyser .....	13
Resultat.....	15
Parasitägg i träckprov från gödselbanden. ....	15
Parasitägg i tarminnehåll från kolon och kloak.....	16
Medelantalet adulta <i>A. galli</i> . ....	17
Antal lumenala larver .....	17
Antal histotropa larver.....	18
Övriga fynd .....	19
Diskussion .....	19
Referenser.....	22
Tack.....	24



## SAMMANFATTNING

I studien undersöktes effekten av avmaskningsmedlet flubendazol (Verminator<sup>®</sup>) mot tamhönans spolmask *Ascaridia galli*. Undersökningen genomfördes i en flock med frigående värphöns på en kommersiell anläggning i mellersta Sverige. Besättningen hölls inomhus i ett hus med värpreden i två våningsplan och ströbädd. Flocken konstaterades vara monospecifikt infekterad med *A. galli* före försöksstart med träckprovundersökning och PCR. Syftet med studien var att undersöka effekten av avmaskning med flubendazol mot samtliga utvecklingsstadier hos *A. galli* och ta reda på hur snabbt efter avmaskningen som flocken återinfekterades. Försöket startade när besättningen avmaskades med flubendazol via dricksvattnet under sju dagar och det pågick därefter under ytterligare fem veckor. Under försöket samlades poolade träckprov från gödselbanden vid åtta tillfällen för analys av antalet parasitägg. Dessutom insamlades tarmar och tarminnehåll från kolon och kloak från tio slumpmässigt utvalda hönor per undersökningstillfälle för parasitologisk analys. Både McMaster- och MiniFlotacmetoden användes för räkning av antalet parasitägg. Histotropa larver i tarmslemhinnan (mukosan) påvisades med en agargel-inkubationsmetod. Samtliga utvecklingsstadier i tarmlumen analyserades efter silning av tarminnehållet genom okulär besiktning med stereomikroskop. Resultaten visade en i det närmaste total reduktion av antalet spolmaskägg, larver och adulta maskar i tarminnehållet under pågående avmaskning och efter avslutad behandling. Två veckor efter avslutad avmaskning kunde parasitägg inte längre detekteras i tarminnehållet men äggutskiljningen återkom efter fem veckor efter avslutad avmaskning. Även förekomsten av spolmaskägg i poolade träckprov från gödselbanden minskade kraftigt under och efter avmaskningen men 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 vilket talar för att samlingsprover av träck från djurtrymnet är en otillförlitlig indikator för utvärdering av maskmedlets verksamma effekt. Larver i mukosan detekterades aldrig under pågående avmaskning men de påträffades redan en vecka efter avslutad avmaskning. Adulta *A. galli* påträffades i tunntarmen före avmaskningen och under den tredje behandlingsdagen och påträffades ånyo fem veckor efter avslutad avmaskning. Flubendazol hade således full effekt mot samtliga stadier i tarmlumen och mukosan men bara upp till mindre än en vecka efter avslutad behandling. Tidsperioden för fynd av larver och adulta parasiter i tarminnehållet hos de provtagna hönorna efter avslutad avmaskning, överensstämde också väl med de förväntade nedre gränserna för den histotropa fasen (två veckor) och spolmaskens hela livscykel, det vill säga fyra till fem veckor. Fynden understryker att hönorna blev återinfekterade med infektiösa spolmaskägg från miljön direkt efter slutförd avmaskning sannolikt efter att effekten av avmaskningen hade avklingat. Sammanfattningsvis visar försöket att flubendazol är verksamt mot såväl adulta *A. galli* som dess larvstadier i tarmlumen och mukosan om än under en ytterst begränsad tid.





## SUMMARY

The study examined the effect of the deworming agent flubendazole against the chicken roundworm *Ascaridia galli*. The study was conducted in a laying hen flock housed in an aviary indoors on a commercial farm in central Sweden. The hens were kept in a barn with two separate sides, with nest boxes, two tiers and on a litter bed. The flock was found to be mono-specifically infected with *A. galli* before the start of the trial by investigation of parasite eggs in faecal samples and PCR. The aim was to investigate the effect of flubendazole against all developmental stages of *A. galli* and to find out how fast the flock was reinfected. The experiment started when the flock was dewormed with flubendazole (Verminator®) in the drinking water for seven days and was then continued for five weeks. Faecal samples were collected for the analysis of the number of parasite eggs in faeces and intestinal contents (colonic and cloacal contents) on eight sampling occasions. Furthermore, intestinal samples were obtained from ten randomly selected chickens for parasitological analyses. For analysis of parasite eggs we used both the McMaster and MiniFlotac methods. Mucosal larvae were recovered by an agar gel incubation method. All developmental stages of the parasite in the intestinal lumen were analyzed after sieving by visual inspection using a stereo microscope. The results showed that there was a reduction in the number of parasite eggs and worms both during and following treatment. Two weeks post deworming parasite eggs were no longer detected in the intestinal contents, but parasite egg expulsion reappeared within five weeks after deworming. Similarly, there was a reduction of the numbers of parasite eggs in the pooled faecal samples during and after deworming but they never disappeared completely, which suggests that there was a heavy environmental egg contamination and that analysis of faecal samples is not a fully reliable indicator of the anthelmintic efficacy in chicken flocks. No mucosal larvae were detected during treatment but they were re-established one week after deworming. Adult worms were present in the small intestine before treatment, during treatment (on day three) and then again five weeks following treatment. Flubendazole eliminated all developmental stages in the intestinal lumen and mucosa but only for approximately a week after treatment. The time period for the reappearance of luminal larvae and adult worms was consistent with the lower limit of the histotropic phase and life-cycle, i.e. two and four to five weeks post treatment respectively. This underlines that the hens were re-infected with ascarid eggs from the environment soon after completed deworming when the temporary effect of treatment had waned. In summary, we found that flubendazole is active against both adult *A. galli* and its larval stages in both the intestinal lumen and in the mucosa, although for a very short period.



## INLEDNING

Förekomsten av spolmasken *Ascaridia galli* i kommersiella värphönsbesättningar har ökat markant under senare år i Sverige (Jansson et al, 2010). Detta är ett resultat av omställningen från traditionella oinredda burar till inredda burar och frigående system inom- och utomhus som var genomförd i Sverige 2005. Parasiten förekommer allmänt hos hönsfåglar i hela världen (Ackert, 1931; Permin & Hansen, 1998; Skallerup et al, 2005; Taylor et al, 2007) men har varit av underordnad betydelse i kommersiell värphönshållning i oinredda burar (Jansson et al, 2010). Spolmaskinfektion ger vid hög maskbörda upphov till nedsatt djurhälsa hos värphöns och har angetts som orsak till tarminflammation, tarmobstruktion, anemi, nedsatt tillväxt, avmagring, diarré och beteendeförändringar (Ikeme, 1971a; Ikeme, 1971b; Ramadan & Abou Znada, 1992; Kilpinen et al, 2005; Gaulty et al, 2007) Ekonomiska förluster är en följd av minskad äggproduktion och ökad foderkonsumtion (Ikeme, 1971b). Det är även visat att en samtidig infektion med *Escherichia coli* eller med *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* leder till ökad sjuklighet (Permin et al, 2006; Dahl et al, 2002). Spolmaskägg misstänks även fungera som en vektor för salmonellabakterier (Chadfield et al, 2001). Ägg från *A. galli* och den närbesläktade nematoden *Heterakis gallinarum* är svåra att differentiera genom undersökning av äggens morfologi. De går dock att skilja dem åt med en nyligen utvecklad PCR-metod (Höglund et al., opublicerade resultat).

Livscykeln hos *A. galli* påbörjas då fåglarna födosöker och samtidigt sväljer infektiösa spolmaskägg som finns i miljön. Tiden som krävs för att oembryonerade spolmaskägg ska utvecklas till infektiösa larver (L3) är temperatur- och fuktberoende och tar cirka två veckor vid optimala betingelser. När de infektiösa äggen svalts kläcks de i tunntarmen varefter larverna går in i en histotropisk fas i mukosan. Enligt tidigare studier är larverna inbäddade i mukosan mellan två och sju veckor (Tugwell & Ackert, 1952; Herd & McNaught, 1975; Luna-Olivares et al, 2012). När de sedan återkommer till tarmlumen fullbordas utvecklingen till vuxna reproduktiva spolmaskar. På motsvarande sätt varierar prepatensperioden, det vill säga tiden från infektion till dess att nya ägg kan detekteras i träcken. Enligt litteraturen är prepatensperioden mellan fyra och nio veckor, samtidigt som det har angivits att tiden är något längre hos äldre hönor (Anderson RC, 1992; Taylor et al, 2007). Det finns även en studie som visar att äggutskiljning kan påvisas redan efter två till fyra veckor efter avslutad avmaskning med flubendazol (Höglund & Jansson, 2011).

Idag finns endast avmaskningsmedel med den verksamma substansen flubendazol (FLBZ), vilket är ett anthelmintikum av benzimidazoltyp, mot spolmask till värphöns i Europa. Läkemedlet saluförs i Sverige som en oral emulsion, Verminator<sup>®</sup>, vilken ska blandas i dricksvattnet och distribueras via dricksvattenledningarna till djuren några timmar dagligen under sju dagar i följd. FLBZ har enligt muntliga uppgifter god effekt mot parasitens samtliga utvecklingsstadier (M. de Gussem, Vetworks Belgien, personligt meddelande). Det är dock samtidigt viktigt att poängtera att det saknas tillgång till offentliga vetenskapliga studier som styrker detta förhållande, vilket avspeglas i FASS VET där indikationen för FLBZ till

tamhöns endast omfattar vuxna spolmaskar. Målet med denna studie var därför att utreda effekten av FLBZ på samtliga parasitstadier i en fältbesättning med värphöns som avmaskades enligt läkemedelföretagets rekommendation. Möjliga förklaringar till den förkortade prepatensperioden som observerats i en tidigare studie (Höglund & Jansson, 2011) har även undersökts. Unikt för studien jämfört med tidigare publicerade resultat var att avmaskningseffekten förutom genom analyser av äggutskiljning även undersöktes genom parasitologisk undersökning av tarminnehåll och mukosa.

## **MATERIAL & METODER**

### ***Urval och flockdata***

Studien utfördes hösten 2012 i en kommersiell värphönsbesättning som tidigare konstaterats vara naturligt monoinficerad med *A. galli* enligt träckprov- och PCR-undersökning av parasitäggen i samband med provtagning inom branschorganisationens SFS Svenska Äggs spolmaskkontrollprogram ([www.svenskaagg.se](http://www.svenskaagg.se)) (Höglund et al., opublicerade resultat). Resultatet för flocken som ingick i projektet konfirmerades med samma metoder även omedelbart före försöksstart. Vid valet av besättning togs hänsyn till att avståndet från gården till laboratoriet vid SLU i Uppsala skulle vara så kort som möjligt för att larverna i mukosan skulle kunna överleva transporten från produktionsanläggningen till laboratoriet. Värphönsbesättningen låg cirka 2,5 timmes bilresa från Uppsala. Försöksflocken bestod vid försöksstart av 6902 värphöns av hybriderna Hyline CV22 som oberoende av denna undersökning skulle avmaskas. Flocken hölls inomhus i ett hus delat i två separata avdelningar med värpreden i två våningsplan (NATURA-Nova-inredning (Big Dutchman)) och med ströbädd. Hönsen var vid insättningen i besättningen 16 veckor gamla och de var dessförinnan konstaterade parasitfria. Det påvisades inte heller några parasitägg vid träckprovtagning vid 24 veckors ålder. Vid provtagning vid 38 veckors ålder konstaterades det att flocken var infekterad med rundmask varefter den avmaskades. När flocken provtogs återigen vid 56 veckors ålder var den infekterad på nytt varefter beslut fattades om ytterligare en avmaskning som påbörjades vid 67 veckors ålder.

### ***Provtagning på gården***

Djurförsöksetiskt tillstånd fanns beviljat för provtagningen innan försöket påbörjades. Försöket startade då hönorna var 67 veckor gamla, och pågick under sammanlagt sex veckor med start den första avmaskningsdagen. Sammanlagt avmaskades hönorna dagligen cirka fyra timmar med FLBZ (Verminator<sup>®</sup>) under sju dagar via dricksvattnet enligt läkemedelstillverkarens rekommendation.

Vid sammanlagt åtta provtagningstillfällen utvaldes randomiserat fem hönor från vardera sidan i hönshuset för provtagning. Hönorna avlivades enligt gällande lagstiftning (SJVFS 2012:26 Saknr L 150) genom att de först bedövades med ett kraftigt slag mot huvudet varefter

halskotpelaren bröts genom halsdislokation. Efter avlivningen uttogs tarmen genom att två snitt lades, ett mellan muskelmagen och duodenum, och det andra vid kloaköppningen. Tarmen med kloakinnehåll insamlades dag 1 (nollprov) före start av avmaskningen samt dag 3 (prov 2) och dag 7 (prov 3). Därefter togs prover en gång i veckan med en veckas mellanrum. Det sista provet togs fem veckor efter att behandlingen hade avslutats. Tarmarna lades i individuella burkar med lock som numrerades och transporterades till laboratoriet i en kylväska utan kylklampar (ca 15-20°C) för att minimera risken för nedkylning av eventuella histotropa larver.

Vid samtliga åtta provtagningstillfällen insamlades även färskt träck från gödselbanden under de nedre våningsplanen (samlingsprover, fyra prover à 1dl) för att mäta utskiljningen av spolmaskägg i träcken. Två prover togs på varje sida i hönshuset ca 1/3 respektive 2/3 in på längden på respektive gödselband. Varje provtagning föregicks av utgödsling dagen innan, för att säkerställa att träckproverna skulle vara så färska som möjligt. Precis som vid insamlingen av tarmen togs nollprover dag 1 (prov 1) innan avmaskningen påbörjades. Samtliga träckprover från gödselbanden transporterades till laboratoriet i kylväska med kylklampar.

### **Laboratorieanalyser**

Den insamlade träcken, från gödselbanden blandades väl vid framkomsten till laboratoriet och antalet parasitägg i de poolade träckproven räknades med två oberoende metoder. Dels användes MacMaster-metoden som bygger på undersökning av 3 gram träck, dels MiniFlotac-metoden där vi i detta fall använde 0,5 gram träck men där varje räknekammare rymmer 0,5 ml istället för 0,15 ml. Detta innebär att den teoretiska minsta detektionsnivån är 50 epg (ägg per gram träck) oberoende av metodval. När man baserar McMaster-metoden på 3 g träck som blandas med 42 ml vatten har den en sensitivitet på 50 epg ( $epg = D/V$  där  $epg$  = antalet ägg per gram undersökt träck och  $D$  = spädningsfaktorn, och  $V$  = räknekammararnas volym = 0,3 ml). Även MiniFlotac har en sensitivitet på 50 epg när den baseras på provmängden 0,5 g träck (Cringoli, Faculty of Veterinary Medicine of the University of Naples Federico II, Italy).

Med start direkt efter framkomst till laboratoriet, cirka 2,5 - 4 timmar efter avlivningen, klipptes tarmen upp varvid tarminnehållet processades för undersökning. Vid samtliga analystillfällen togs individmärkta prover av tarminnehållet från kolon och kloak för analys av antalet utskiljda spolmaskägg från varje enskild höna med MiniFlotac-metoden. Vi använde normalt 0,5 gram men vid några tillfällen en något mindre mängd i de fall det fanns för lite tarminnehåll. Tarminnehållet från duodenum, jejunum och ileum blandades med 1 l rumstempererat kranvatten och silades genom ett durkslag. Antalet *A. galli* i tarmlumen (både larver och vuxna maskar) räknades därefter och de vuxna maskarna könsbestämdes. Både de maskar som var så stora att de silades bort och det silade tarminnehållet i två underprover à 20 ml av filtratet analyserades med stereomikroskop.

Antalet *A. galli*-larver i mukosan i tunntarmen analyserades med en agargel-inkubationmetod modifierad efter Slotved et al, 1996; Murrell et al, 1997; Ferdushy et al, 2012. Enligt den modifierade metoden som användes i försöket skrapades mukosan loss från muskularislagret i

tarmen med ett objektglas och späddes sedan med cirka 1 dl 39°C fysiologisk (0,9 %) NaCl-lösning, som i sin tur blandades med ca 1 dl av en 3 % gulagarlösning vid samma temperatur. Blandningen gjöts därefter som ett tunt lager över en fiberduk (Johnson universalduk). När gulagarn stelnat nedsänktes duken i en glasvanna med ca cirka 1,5 L 39 °C fysiologisk NaCl-lösning (Bild 1). Agargjutningarna inkuberades i värmeskåp (39 °C) över natt så att larverna kunde vandra ut i koksaltlösningen och sedimentera till botten. I försöket varierade inkubationstiden i värmeskåpen mellan 13 och 21 timmar. Därefter flyttades glasvannorna ut från värmeskåpet och agarduken lyftes bort. Koksaltlösningen fick sedan stå i minst en timme varvid larverna sedimenterade till botten igen. Cirka 2/3 av överståndet sögs bort med en vattensug. Återstoden hölls upp i ett cirka 1,5 liter stort snapsglas och fylldes upp med rumstempererat kranvatten. Larverna fick återigen sedimentera i minst två timmar varefter överståndet sögs bort så det endast fanns cirka 50-70 ml vätska kvar. Innehållet hölls upp i plastburkar med lock och vätskan undersöktes slutligen med stereomikroskop.

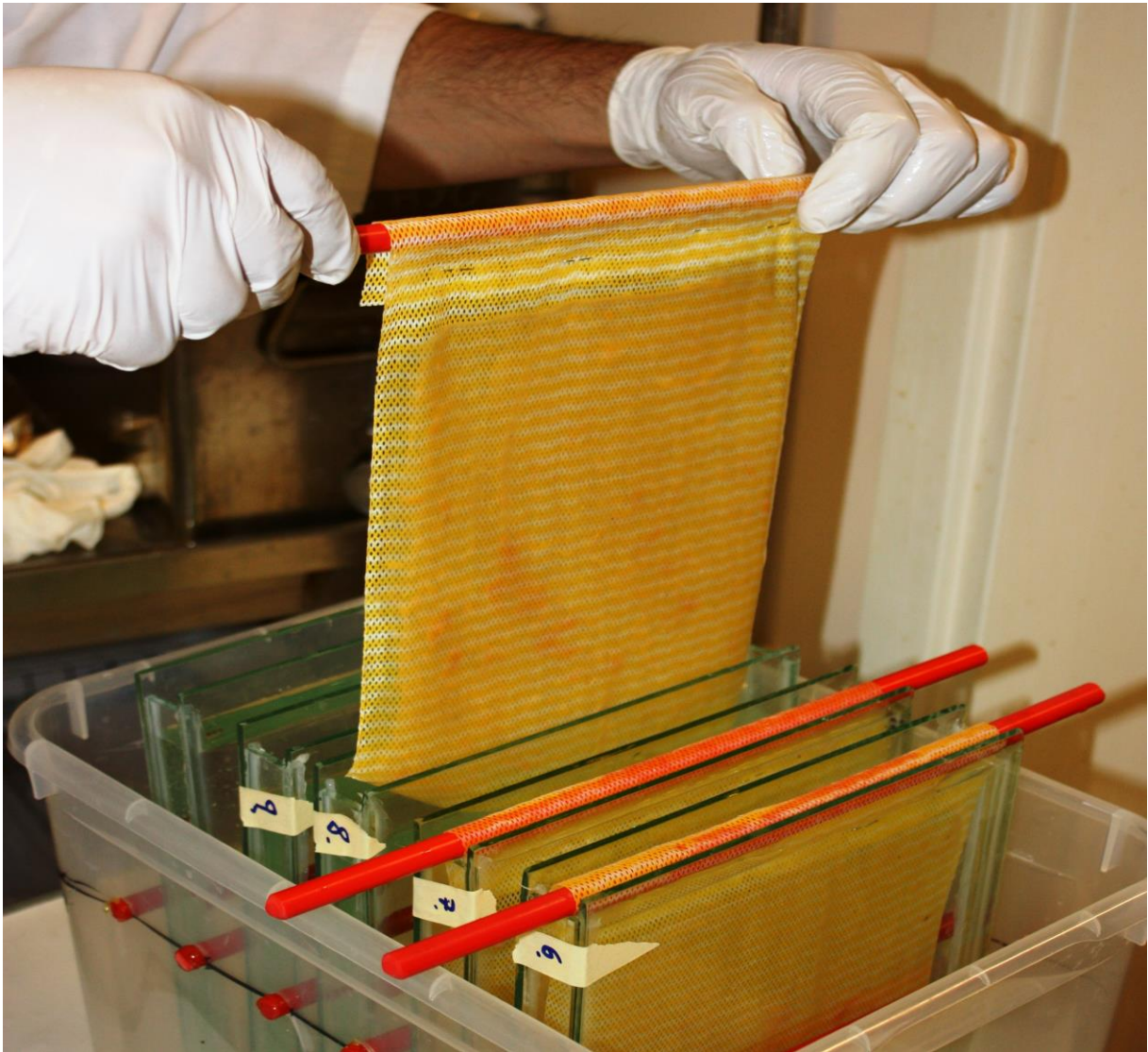
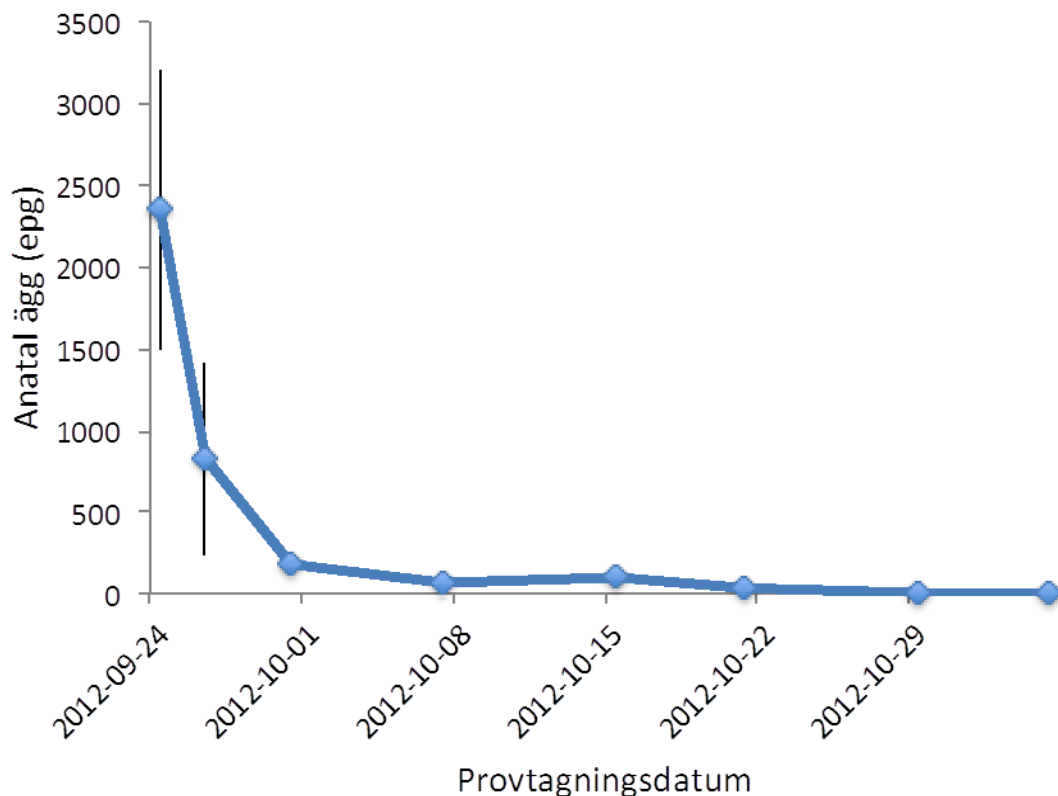


Bild 1. Glasvannor fyllda med fysiologisk NaCl-lösning och nedsänkta universaldukar med agargjutningar (Foto D. Jansson, 2012).

## RESULTAT

### *Parasitägg i träckprov från gödselbanden.*

Medelantalet spolmaskägg i gödselbandsproverna som undersöktes med McMaster-metoden, presenteras i figur 1. Innan avmaskningen påbörjades noterades i medeltal  $2350 \pm 859$  epg (ägg per gram träck). Vid det andra provtagningstillfället (dag 3) var antalet  $825 \pm 592$  epg, och efter sju dagars avmaskning var medelvärdet  $175 \pm 50$  epg. En vecka efter avslutad avmaskning registrerades ett medelvärde på  $63 \pm 25$  epg, och efter två veckor var medelvärdet  $100 \pm 71$  epg. Däremot efter tre, fyra och fem veckor efter avslutad avmaskning hade antalet ägg på gödselmattan minskat till i medeltal mellan endast  $8 \pm 5$  och  $40 \pm 20$  epg, där det lägsta medelvärdet noterades fyra veckor efter avslutad behandling. Resultaten visar sammantaget att antalet ägg i de poolade färska träckproverna från gödselbanden minskade kraftigt upp till fem veckor efter avmaskningen men att de aldrig gick ner till noll.



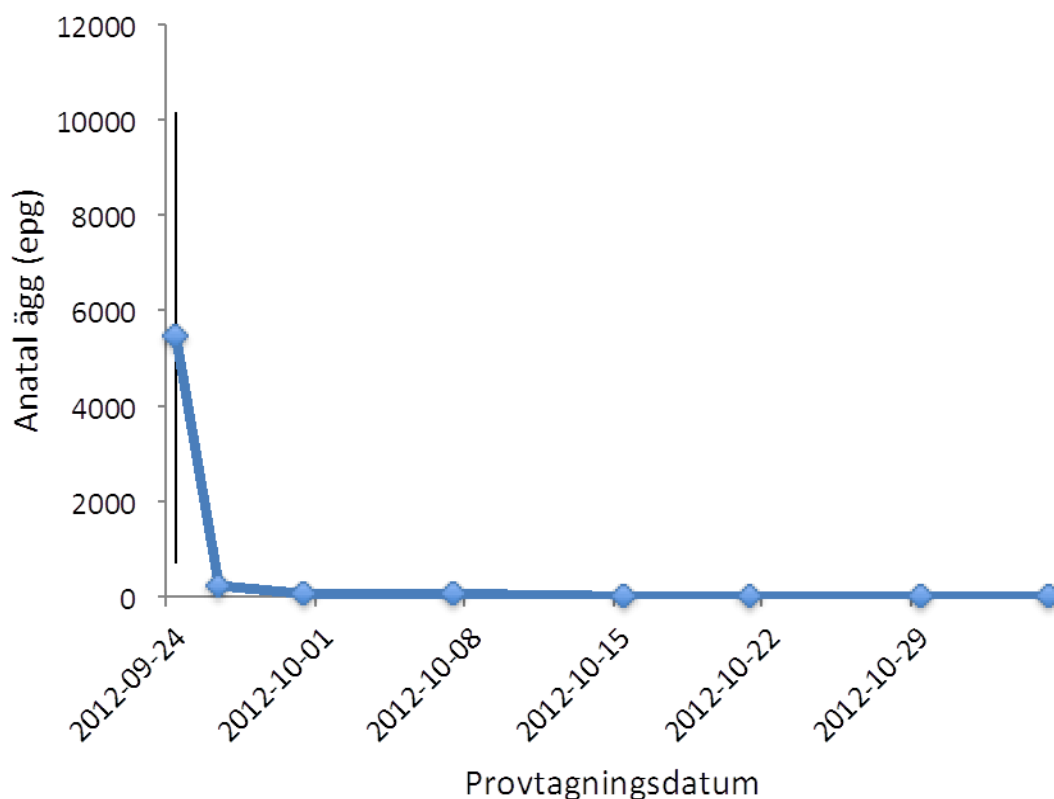
Figur 1. Medelantalet (+SD) spolmaskägg per gram träck (epg) i fyra prover från gödselbanden vid samtliga provtagningstillfällen vid undersökning med McMaster-metoden. Första provet (2012-09-24) representerar 0-prov före avmaskning.

Med MiniFlotac-metoden noterades innan avmaskning i medeltal  $4725 \pm 1215$  epg. Vid det andra provtagningstillfället var antalet nere på  $700 \pm 305$  epg och vid tredje provtagningen var medelvärdet  $275 \pm 235$  epg. En vecka efter avslutad avmaskning registrerades ett medelvärde

på  $38 \pm 48$  epg, två veckor efter avslutad avmaskning var medelvärdet  $88 \pm 63$ epg och efter tre veckor var medelvärdet  $25 \pm 29$  epg. Fyra och fem veckor efter avslutad avmaskning kunde inga parasitägg detekteras med MiniFlotac-metoden.

### **Parasitägg i tarminnehåll från kolon och kloak**

Medelantalet spolmaskägg som påvisades med MiniFlotac-metoden i tarminnehållet från kolon och kloak från tio hönor minskade kraftigt efter påbörjad avmaskning (figur 2). Medelantalet parasitägg innan avmaskning var  $5435 \pm 4730$  epg medan medelantalet efter tre dagars behandling sjönk till  $235 \pm 224$  epg. Vid tredje provtagningen var medelvärdet  $65 \pm 108$  epg. Antalet parasitägg fortsatte därefter att minska ytterligare. En vecka efter avslutad avmaskning var medelvärdet  $60 \pm 124$  epg och efter två veckor var medelvärdet  $15 \pm 34$  epg. Tre och fyra veckor efter avslutad avmaskning detekterades inga spolmaskägg. Däremot påvisades åter spolmaskägg från en höna fem veckor efter avslutad behandling och medelvärdet för samtliga provtagna hönor vid detta tillfälle var  $5 \pm 16$ . Hönan som utskiljde parasitägg vid detta tillfälle bar även på vuxna spolmaskar av båda könen (se nästa stycke).



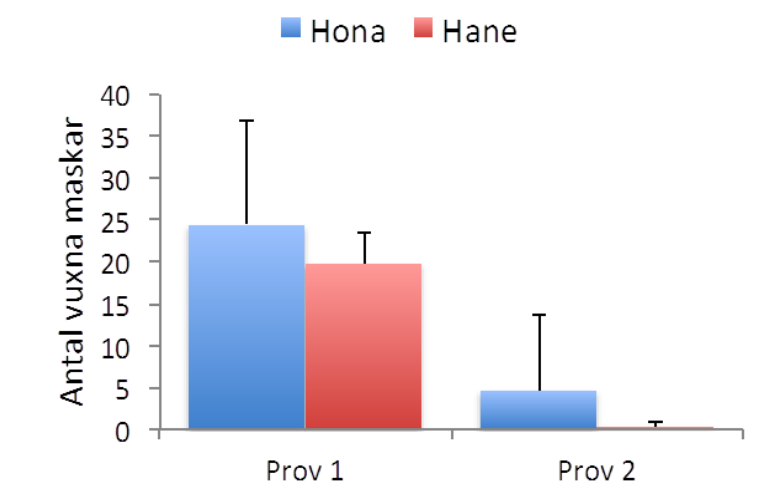
Figur 2. Medelantalet (+SD) spolmaskägg (*Ascaridia galli*) hos tio slumpmässigt provtagna värphöns visat som ägg per gram träck (epg) i tarminnehållet hos värphöns i samband med



avmaskning med flubendazol. Första provet (2012-09-24) representerar 0-prov före avmaskning. Antalet parasitägg påvisades med MiniFlotac-metoden.

### **Medelantalet adulta *A. galli*.**

Vuxna spolmaskar i tarmen påträffades endast vid tre tillfällen, nämligen dag 1 (0-prov) och dag 3 (figur 3) och vid den sista provtagningen fem veckor efter avslutad avmaskning. När antalet spolmaskar i tarmlumen räknades före avmaskningen startade, påträffades i medeltal  $44 \pm 21$  vuxna maskar per höna. Förhållandet mellan antal honor och hanar var då 5:4. Den tredje avmaskningsdagen hade antalet vuxna maskar minskat till i medeltal  $5 \pm 4$  maskar per höna. Vid detta tillfälle påträffades nästan enbart honor och förhållandet mellan könen var 23:1. Däremot hittades inga adulta *A. galli* i tarmen mellan tredje provtagningen, dag 7, och upp till och med fyra veckor efter avslutad avmaskning. Två vuxna maskar, en hona och en hane, noterades vid den sista provtagningen fem veckor efter avslutad avmaskning hos en höna. Resultaten visar att FLBZ hade god effekt mot adulta *A. galli* samtidigt som honorna överlevde avmaskningen längre än hanarna (figur 3). Det kan också konstateras att prepatensperioden för *A. galli* i denna studie var mellan fyra och fem veckor.



Figur 3. Medelantal vuxna (adulta) spolmaskar (*Ascardia galli*) ( $\pm$ SD) i tarmlumen hos tio provtagna höns vid de två första provtagningstillfällena dag 1 och dag 3 under pågående avmaskning med flubendazol.

### **Antal lumenala larver**

Lumenala larver av olika storlek (bild 2) detekterades såväl i koncentratet av den vätska som återstod efter silning av tarminnehållet som i underproverna som togs efter silningen. Genomsnittet innan avmaskningen var  $9 \pm 10$  larver per höna. Dock hade antalet lumenala

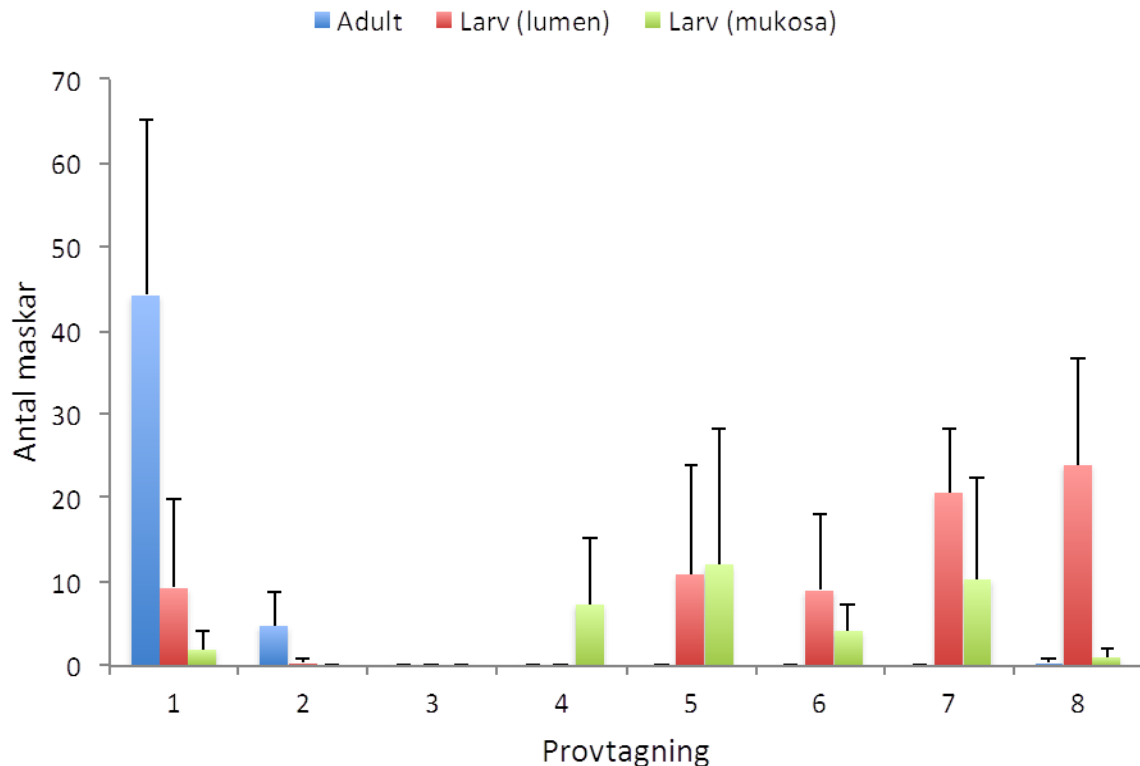
larver reducerats kraftigt tre dagar efter påbörjad avmaskning och medelvärdet var då  $0,2 \pm 0,6$  larver per höna. Efter en vecka detekterades däremot inga larver. De hittades dock återigen i tarmlumen två veckor efter avslutad behandling (figur 4). Storleken på de återfunna larverna i tarmlumen, efter att avmaskningen hade upphört, ökade successivt till och med det sista provtagningsstillfället.



Bild 2. Lumenala *A.galli* larver (Foto J. Höglund, 2012).

### ***Antal histotropa larver***

Innan avmaskningen startade påvisades i genomsnitt  $2 \pm 2$  larver per höna i tunntarmsmukosan. Däremot påvisades inga larver dag 3 eller dag 7 under pågående avmaskning. Larverna återkom i mukosan redan en vecka efter avslutad avmaskning. Vid de fem sista provtagningsstillfällena återfanns i genomsnitt mellan 1 och 12 larver per tarm (figur 4).



Figur 4. Det genomsnittliga antalet ( $\pm$ SD) adulta *Ascaridia galli*, samt antalet larver i tarmlumen och inbäddade i tunntarmens mukosa under och efter avmaskning med flubendazol av 10 slumpmässigt utvalda värphöns. Prov 1 togs 2012-09-24 och prov 8, 2012-11-04. Notera att det bara är sju dagar mellan prov 1 och 3. Övriga prover (4 till 8) togs med en veckas mellanrum.

### Övriga fynd

Under pågående avmaskning upp till två veckor efter avslutad avmaskning kunde lindrig till måttlig hyperemi samt petechiella och echymatösa blödningar ses i tunntarmsmukosan hos flertalet av de provtagna hönorna.

## DISKUSSION

Syftet med denna studie var att undersöka effekten av FLBZ mot *A. galli* i en kommersiell värphönsbesättning. Det har under lång tid varit oklart hur detta avmaskningsmedel verkar mot parasitens olika utvecklingsstadier i värdjurets tarm.

Vuxna maskar kunde inte detekteras en vecka efter påbörjad avmaskning men återfanns vid det sista provtagningstillfället fem veckor efter avslutad behandling hos en höna. Parasitens larvstadier i tarmlumen kunde inte heller detekteras efter en veckas behandling men hittades

till skillnad från vuxna maskar redan två veckor efter avslutad avmaskning. På motsvarande sätt hittades inga histotropa larver i tunntarmsmukosan efter tre dagars avmaskning men de var återetablerade redan inom en vecka efter avslutad behandling. Även antalet ägg i tarminnehållet från kolon och kloaken minskade under pågående avmaskning och inga ägg detekterades under en två veckor lång period tre till fyra veckor efter avslutad behandling. Dock kunde vi påvisa utskiljning av spolmaskägg fem veckor efter avslutad behandling vilket sammanföll med att två vuxna spolmaskar påträffades hos en av tio undersökta hönor. På motsvarande vis sågs en minskning av antalet spolmaskägg i träckproven från gödselmattorna. Till skillnad från de prover som togs direkt från tarminnehållet hos hönsen, kunde ett litet antal ägg detekteras under hela försöket i träckproverna från gödselbanden. Sammantaget visar våra resultat att avmaskningen med FLBZ hade en fullgod men ytterst kortvarig effekt i den studerade flocken.

Den fem veckor långa frånvaron av adulta maskar och den tid då larver och spolmaskägg ej påvisades i tarminnehållet överensstämmer med den förväntade längden av den histotropa fasen och faller inom det tidsintervall som anges som prepatensperiod för *A. galli* (Ackert et al, 1932; Anderson, 1992; Taylor et al, 2007). Två köns mogna *A. galli* hittades hos en av tio hönor fem veckor efter att behandlingen hade avslutats. Från samma höna hittades även spolmaskägg i dess tarminnehåll, vilket bekräftar att prepatensperioden för *A. galli* i denna flock fullbordades inom fyra till fem veckor. Detta visar även att hönorna var mottagliga för reinfektion redan någon dag efter det att avmaskningen hade avslutats. Jämfört med litteraturuppgifter var prepatensperioden i denna studie kortare än förväntat, i synnerhet som denna studie utfördes i en flock med äldre hönor och där *A. galli* enligt uppgifter i äldre litteratur har en längre prepatensperiod än kycklingar (Ackert et al, 1932).

Träckproverna från gödselbanden var aldrig negativa avseende spolmaskägg i detta försök. Även om ett litet antal spolmaskägg påträffades vid samtliga provtagningstillfällen efter avmaskningen, var motsvarande prov från tarminnehållet under två veckor samtidigt negativa. Detta tyder på att analysresultat från prover tagna från gödselbanden inte fullt ut avspeglar avmaskningseffekten. Samtidigt kan det inte helt uteslutas att det bland övriga ej provtagna hönor i flocken fanns sådana som utskiljde parasitägg. Å andra sidan rengjordes aldrig djurmiljön under försöket på annat sätt än att gödselmattorna kördes rena (mekanisk tömning) kvällen innan vi tog våra prover. Det troligaste är därför att de fynd av spolmaskägg som gjordes i träckprover från gödselbanden var parasitägg som fanns kvar i den kraftigt kontaminerade miljön. Detta är en viktig slutsats för framtida studier för bedömningen av avmaskningsmedlets effekt i fältbesättningar. Detta utgör vidare en sannolik förklaring till resultaten i en tidigare studie som visade att äggutskiljning från spolmaskinfekterade och avmaskade höns återkom redan inom två till fyra veckor efter avslutad avmaskning, vilket är en kortare tid än den kända prepatensperioden för parasiten. Dessvärre saknas det liknande studier som dessa nyvunna resultat kan jämföras med.

Resultaten som redovisas i figur 1, från proverna från gödselbanden, undersöktes genom McMaster räkning. Det visade sig att McMaster-metoden var känsligare än MiniFlotac-

metoden som vid ett par provtagningstillfällen gav negativa resultat. Orsaken är troligen att för McMaster analys används 3 gram träck medan endast 0,5 gram används i MiniFlotac-metoden. Dock fick vi vid analysen vid första provtagningstillfället ett medelantal epg som var dubbelt så högt vid analys med MiniFlotac-metoden jämfört med McMaster-metoden. Antalet *A. galli* ägg i tarminnehållet från kolon och kloak analyserades i denna studie enbart med hjälp av MiniFlotac-metoden. Denna metod är att föredra i de fall det är svårt att samla stora mängder träck från varje individ. Det krävs dock ytterligare jämförande studier för att ta reda på hur de båda detektionsmetoderna förhåller sig till varandra.

Vid tarmundersökningen noterades förutom vuxna parasiter även larvförekomsten både i tarminnehållet och i mukosan. Den agargel-inkubationsmetod som användes i denna studie bygger på att larverna stimuleras att migrera ut från mukosan till en omgivande 39 °C fysiologisk koksaltlösning. När larverna sedimenterat kan de räknas efter anrikning. Med denna metod kan antalet larver kvantifieras och det var möjligt att fastställa tidpunkten när de återetablerades i förhållande till avmaskningen. Agargel-inkubationsmetoden är enligt Ferdushy et al. (2012) den bästa metoden för isolering av viabla *A. galli* larver i tarmslemhinnan för fortsatta molekylära och immunologiska undersökningar eftersom de per definition är intakta. En annan metod för isolering av nematodlarver från vävnader är genom pepsin-HCl digestion. Den är att föredra när man vill maximera antalet larver som isoleras (Ferdushy et al, 2012). Att vårt val föll på agargel-inkubationsmetoden i denna studie baserades på det faktum att vi var intresserade av att kvantifiera antalet viabla larver som var opåverkade av avmaskningsmedlet.

Enligt Ferdushy et al. (2012), påträffas endast 18,2% av antalet inokulerade *A. galli* ägg som larver med agargel-inkubationsmetoden tre dagar efter experimentell infektion. Det kan därför inte uteslutas att det fanns överlevande larver kvar i mukosan i vårt försök. Jämfört med den tidigare studien var dessutom tiden mellan avlivning och preparering längre i vårt försök vilket sannolikt inverkar negativt på metodens effektivitet. Vi använde oss dessutom av en modifierad metod såtillvida att vi skrapade av mukosan från muskularislagret, till skillnad från Ferdushy et al. (2012) som gjöt in intakta tunntarmar i gulagarn. Även om vi bedömer det som att vår modifiering potentiellt ökar känsligheten hos metoden, behöver detta undersökas närmare. Våra fynd av larver som hittades i mukosan och tarmlumen en kort tid efter avslutad avmaskning visar trots allt att hönorna återinfekteras snabbt med infektiösa ägg som fanns kvar i hönornas omgivning efter avmaskning, vilket är i överensstämmelse med Permin & Hansen (1998). Våra resultat visar att larver som kläcks ur ägg som kommer ner i tarmen penetrerar mukosan inom mindre än en vecka efter avslutad avmaskning. Dessa återetableras sedan snabbt i tarmlumen varefter de inom ytterligare några veckor tillväxer till adulta maskar. I stora drag överensstämmer detta med tidigare observationer (Tugwell & Ackert, 1952; Herd & McNaught, 1974; Luna-Olivares et al, 2012).

Sammanfattningsvis, enligt våra observationer hade FLBZ fullgod effekt även mot de larver av *A. galli* som fanns inbäddade i mukosan. Våra resultat visar dock samtidigt att avmaskningen hade en kortvarig effekt eftersom hönorna snabbt återinfekterades med

infektiva spolmaskäggs som inom fyra till fem veckor efter avslutad behandling utvecklades till adulta maskar.

Under försöket sågs hyperemi och blödningar i tunntarmsmukosan hos flera avlivade hönor. Skadorna noterades framförallt under pågående avmaskning och upp till två veckor efter att behandlingen hade avslutats. Dessa fynd var oväntade eftersom de tyder på att avmaskning vid kronisk spolmaskinfektion eventuellt kan orsaka skador eller retning i tarmslemhinnan. Mikroskopisk undersökning av de iakttagna förändringarna i tunntarmslemhinnan utfördes ej och orsakssambanden är därmed inte klarlagda. Det är däremot beskrivet att larvernas invasion av tunntarmsmukosan är associerad med blödningar och inflammation (Ackert & Herrick, 1928; Ikeme, 1971b). Det är dessutom fortfarande oklart vilken inverkan de vuxna spolmaskarna i kombination med avmaskningsmedlet har på mukosan. De blödningar som observerades i mukosan är ett potentiellt hälso- och djurvälfräds problem och bör tas i beaktande i kommande studier. Det bör även undersökas närmare hur avmaskningen påverkar fåglar som bär på en kronisk spolmaskinfektion eftersom det finns resultat som tyder på att maskbördan efter avmaskning är högre än före avmaskning (Höglund & Jansson, 2011). Dock är avmaskning idag det mest effektiva sättet att hantera och förebygga höga maskbördor som ger hälsostörningar. Man bör även titta närmare på om det är bättre att börja avmaskningen i ett tidigare skede än vid en massiv kronisk infektion. Eventuellt kan den sämst valda tidpunkten för avmaskning, både ur ett djurhälso- och produktionsperspektiv vara då ett stort antal maskar redan finns etablerade i fåglarnas tarmar.

## REFERENSER

- Ackert, J.E., Herrick, C.A. (1928) Effects of the nematode *Ascaridia lineata* (Schneider) on growing chickens. *The Journal of Parasitology* 15, 1-13
- Ackert, J.E. (1931) The morphology and life history of the fowl nematode *Ascaridia lineata*. *Journal of Parasitology* 23, 360-379
- Ackert, J.E., Porter, D.A., Beach, T.D. (1932) Age resistance of chickens to the parasite *Ascaridia lineata*. *Journal of Parasitology* 19, 157
- Anderson, R.C. (1992) *Nematodes and parasites of vertebrates. Their development and transmission*. CAB International, Wallingford, UK, ss. 247-248
- Chadfield, M., Permin, A., Nansen, P., Bisgaard, M. (2001) Investigations of the parasitic nematode *Ascaridia galli* (Shrank 1788) as a potential vector for *Salmonella enterica* dissemination in poultry. *Journal of Parasitology Research* 87, 317-325
- Dahl, C., Permin, A., Christensen, J.P., Bisgaard, M., Muhairwa, A.P., Petersen, K.M.D., Poulsen, J.S.D., Jensen, A.L. (2002) The effect of concurrent infections with *Pasteurella multocida* and *Ascaridia galli* on freerange chickens. *Veterinary Microbiology* 86, 313-324
- De Gussem, M. Networks, Belgien [personligt meddelande] (2012).

- Fass. Hemsida [online] Verminator® (2013). Tillgänglig: [http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel\\_produk\\_t.jsp?NplID=20051216000098&DocTypeID=4&UserTypeID=1](http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk_t.jsp?NplID=20051216000098&DocTypeID=4&UserTypeID=1) [2013-04-09]
- Ferdushy, T., Nejsum, P., Roepstorff, A., Thamsborg, S.M., Kyvsgaard, N.C. (2012) *Ascaridia galli* in chickens: intestinal localisation and comparison of methods to isolate the larvae within the first week of infection. *Journal of Parasitology Research* 111, 2273-2279
- Gauly, M., Duss, C., Erhardt, G. (2007) Influence of *Ascaridia galli* infections and anthelmintic treatments on the behaviour and social ranks of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of Veterinary Parasitology* 146, 271-280
- Herd, R.P. & McNaught, D.J. (1975) Arrested development and the histotropic phase of *Ascaridia galli* in the chicken. *International Journal for Parasitology* 5, 401-406
- Höglund, J. & Jansson, D.S. (2011) Infection dynamics of *Ascaridia galli* in non-caged laying hens. *Journal of Veterinary Parasitology* 180, 267-273
- Höglund, J. Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala, Sverige. [personligt meddelande] (2013).
- Ikeme, M.M. (1971a) Observations on the pathogenicity and pathology of *Ascaridia galli*. *Parasitology* 63, 169-179
- Ikeme, M.M. (1971b) Weight changes in chickens placed on different levels of nutrition and varying degrees of repeated dosage with *Ascaridia galli* eggs. *Parasitology* 63, 251-260
- Jansson, D.S., Nyman, A., Vågsholm, I., Christensson, D., Göransson, M., Fossum, O., Höglund, J. (2010) *Ascarid* infections in laying hens kept in different housing systems. *Avian Pathology* 39(6), 525-532
- Kilpinen, O., Roepstorff, A., Permin, A., Nørgaard-Nielsen, G., Lawson, L.G., Simonsen, H.B. (2010) Influence of *Dermanyssus gallinae* and *Ascaridia galli* infections on behaviour and health of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *British Poultry Science* 46, 26-34
- Luna-Olivares, L.A., Ferdushy, T., Kyvsgaard, N.C., Nejsum, P., Thamsborg, S.T., Roepstorff, A., Moesgaard Iburg, T. (2012) Localization of *Ascaridia galli* larvae in the jejunum of chickens 3 days post infection. *Journal of Veterinary Parasitology* 185, 186-193
- Murrell, K.D., Slotved, H.C., Eriksen, L., Bjerregard, J., Nansen, P., (1997) Improved method for the recovery of *Ascarus suum* larvae pig intestinal mucosa. *The Journal of Parasitology* 83, 321-324
- Permin, A. & Hansen, J.W. (1998) *Ascaridia galli* (Shrank, 1788). *Heterakis* spp. I *FAO Animal Health Manual. Epidemiology, Diagnosis and Control of Poultry Parasites*, ss. 25-30. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Permin, A., Christensen, J.P., Bisgaard, M. (2006) Consequences of concurrent *Ascaridia galli* and *Escherichia coli* infections in chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica* 47, 43-54
- Ramadan, H.H., Abou Znada, N.Y. (1991) Some pathological and biochemical-studies on experimental *ascaridiasis* in chickens. *Naarung-food* 35, 71-84
- Skallerup, P., Luna, L.A., Johansen, M.V., Kyvsgaard, N.C. (2005) The impact of natural helminth infections and supplementary protein on growth performance of free-range chickens on smallholder farms in El Sauce, Nicaragua. *Preventive Veterinary Medicine* 69, 229-244
- Slotved, H.C., Roepstorff, A., Barnes, E.H., Eriksen, L., Nansen, P. (1996) Comparison of Two Methods for Recovering Migrating *Ascaris suum* Larvae from the Liver and Lungs of Pigs. *The Journal of Parasitology* 82, 612-615
- SFS Svenska Ägg. Hemsida [online] (2009). *Frivilligt och förebyggande hälsokontrollprogram med avseende på spolmask*. Tillgänglig: <http://www2.svenskaagg.se/attachments/92/1449.pdf> [2013-04-09]

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (2007) *Veterinary Parasitology: Parasites of poultry and gamebird*. 3e upplagan. Blackwell Publishing, ss. 459-534

Tugwell, R.L., Ackert, J.E. (1952) On the tissue phase of the life cycle of the fowl nematode *Ascaridia galli* (Schrank). *The Journal of Parasitology* 38, 277-288

## TACK

Ett stort tack till mina handledare Johan Höglund och Désirée Jansson som stöttat och uppmuntrat mig under studiens gång. Jag vill även passa på och tacka Sofia Sollenberg, Behdad Tarbiat, djurägaren och personalen på gården för all hjälp under studien som gjorde att provtagning och analyser kunde genomföras. Jag vill även passa på att tacka min familj för all hjälp och stöttning under studietiden och för att ni gett mig kraft och inspiration att slutföra mina studier.