SLUTRAPPORT
Kartläggning av tarmhälsa hos ekologisk kyckling och effekt av vaccination mot koccidios
Projektnummer: H1343216

Författare av slutrapport: DVM, PhD, Dipl. ECPVS Désirée Jansson, SVA

BAKGRUND

Ekologisk uppfödning är ett av de snabbast växande segmenten inom animalieproduktionen i Europa och Nordamerika. Orsaken är en kombination av ökad efterfrågan från konsumenter, medvetenhet om miljön och ökande förekomst av antibiotikaresistenta mikroorganismer som kan utgöra ett hot mot människors och djurs hälsa. Ekologisk produktion i EU baseras på globala regler från IFOAM (International Foundation for Organic Agriculture), lagstiftning på EU-nivå (EC 834/2007) och nationellt (SJVFS 2015:29). Producenterna kan dessutom ansluta sig till nationella certifieringsorganisationer som ofta har regler utöver de som styrs av lagstiftningen. Svenska producenter kan bedriva sin verksamhet enligt EU:s lagstiftning eller ansluta sig till en certifieringsorganisation, i Sverige till exempel KRAV.

Regelverket i ekologisk kycklinguppfödning syftar till att gynna djurens välfärd och hälsa, samtidigt som producenterna ska ta hänsyn till miljön, gynna lokala kretslopp och producera livsmedel av hög kvalitet. Några av de viktigaste skillnaderna för KRAV-certifierade gårdar jämfört med konventionell svensk kycklinguppfödning är: lägre djurbeläggning (20 kg/m^2), begränsad flockstorlek (maximalt 4800 kycklingar per flock), krav på utevistelse under vegetationsperioden (minst 4 m^2/kyckling), tillgång till grovfoder hela året, ekologiskt foder som producerats utan pesticider, syntetiska gödningsmedel, syntetiska tillsatser och genmodifierade organismer (GMO). Vid tiden för genomförandet av provtagningen i detta projekt (2014) fick fodret innehålla maximalt 5 % konventionellt producerade proteinråvaror. Koccidiostatika, som används till majoriteten av de svenska konventionellt uppfödda kycklingarna för att hämma koccidieparasiter, är ej tillåtna i ekologisk produktion.

För att uppnå god djurvälfärd och djurhälsa, oavsett produktionssätt, behöver kycklinguppfödare optimera stallmiljö, skötselrutiner, tillgodose djurens näringskrav, möjliggöra för djuren att utföra naturligt beteende och skydda dem från skador och sjukdomar. Det sistnämnda kan vara en utmaning ifråga om smittämnen som är spridda i närmiljön, särskilt om de är svåra att eliminera genom rengöring och desinfektion, och om de sprids fekalt-oralt (via träck). Ett av de smittämnen som under årens lopp har lyfts fram som ett potentiellt problem vid uppfödning av ekologisk kyckling är parasiter inom släktet *Eimeria* (koccidier). Koccidier skadar tarmslemhinnan vid replikation, vilket kan leda till sjukdomen koccidios med diarré, nedsatt allmäntillstånd och hög flockdödlighet. Ett annat sådant smittämne är bakterien *Clostridium perfringens* (CP) som ingår i kycklingens normala tarmflora, men som under vissa omständigheter kan orsaka den allvarliga tarmsjukdomen nekrotiserande enterit (NE) med liknande symtom som koccidios. Sjukdomarna förekommer ofta tillsammans och tarmskador orsakade av koccidier anses vara en av de viktigaste riskfaktorerna för NE. Båda sjukdomarna kan också förekomma i en subklinisk form som utmärks av nedsatt och ojämn tillväxt och lågt foderutnyttjande. Den subkliniska formen av båda sjukdomarna är vanligast och orsakar avsevärda ekonomiska förluster globalt.

Erfarenheter från ekologiska fältbesättningar i Danmark, Kanada och USA talar för att koccidios och NE kan vara viktiga problem i ekologisk kycklingproduktion (Pedersen *et al*., 2003; Fanatico *et al*., 2009; Brady *et al*., 2010). Trots detta är forskning om tarmhälsa hos ekologisk kyckling mycket begränsad såväl internationellt som i Sverige. I konventionell kycklinguppfödning har koccidios förebyggts sedan decennier genom rutinmässig tillsats av koccidiostatika i fodret. Jonoforer är en typ av koccidostatika som har effekt mot både

koccidier och CP (Prescott *et al*., 1978; Elwinger *et al*., 1998; Lanckriet *et al*., 2010) och i Sverige används jonoforen narasin. Före detta projekts genomförande användes inte vaccin mot koccidier i ekologisk produktion. Detta innebar att kycklingarna saknade skydd mot koccidios. I denna slutrapport redovisas ett projekt som genomförts under 2014-15 med fokus på tarmhälsa i ekologisk kycklingproduktion. Målsättningarna med projektet var:

- Att beskriva infektionsförloppet för koccidier av släktet *Eimeria* under fältförhållanden.
- Att identifiera riskperioder för koccidiosutbrott.
- Att kartlägga förekomsten av NE och toxingenen *netB* (som utgör den viktigaste virulensgenen hos CP) bland CP-stammar i tarmen hos ekologiska kyckling.
- Att undersöka om vaccination mot koccidier med ett kommersiellt attenuerat vaccin minskar förekomst av koccidios hos kycklingarna.
- Att identifiera andra potentiella hälsoproblem i ekologisk kycklingproduktion.

MATERIAL & METODER

Djurmaterial och uppfödningssätt: Under 2014, när provtagningen i detta projekt utfördes fanns det i Sverige endast tillgång till snabbväxande genotyper. Detta skiljer sig från situationen i de flesta andra EU-länder där långsamväxande genotyper används i ekologisk kycklinguppfödning. Snabbväxande genotyper är tillåtna i Sverige i ekologiska besättningar under förutsättning att tillväxten begränsas och att de slaktas vid tidigast 70 dagars ålder (SJVFS 2015:29). Inklusionskriterier för gårdarna i projektet definierades som:

1. Vaccin mot koccidier hade inte använts under de senaste tio åren på gården.
2. Separering av kycklingar i olika flockar var möjlig (för att förhindra spridning av oocystor (koccidiernas infektiva stadium) mellan vaccinerade/ovaccinerade kycklingar.
3. Provtagningen kunde starta våren 2014 ungefär samtidigt på de olika gårdarna.
4. Kycklingarna skulle få möjlighet att vistas utomhus från cirka fyra veckors ålder.
5. Tidsförskjutningen mellan flockarna på respektive gård skulle vara så kort som möjlig.
6. Djurägarna var villiga att delta.

Två ekologiska gårdar i södra Sverige uppfyllde ovanstående kriterier. De producerade 42 000 respektive 95 000 kycklingar 2013. Med undantag för vaccination (se nedan) följdes gårdarnas normala rutiner. Två försöksflockar per gård ingick i projektet; A1 och A2 på gård A, respektive B1 och B2 på gård B. Antalet insatta kycklingar per flock var 4800. Flockarna följdes under 70 dagar från insättning till slakt. Kycklingarna kom från samma kläckeri som daggamla och var av hybriden Ross 308. På gård B hade nästan samtliga (95 %) kycklingar i båda flockarna samma föräldrar, medan kycklingarna på gård A kom från olika föräldraflockar, som inte heller var föräldrar till kycklingarna på gård B. Kycklingarna sattes in i början av april 2014, och flock A2 och B2 anlände fem veckor efter flock A1 respektive B1. De första tre veckorna hölls kycklingarna i ett startstall på halm, med temperatur enligt Ross broiler Management Handbook 2014, mekanisk ventilation, och fri tillgång till vatten och foder. En fysisk hygienbarriär skiljde kycklingarna från förrummet. Flock 1 och 2 på respektive gård föddes upp under identiska förhållanden i samma startstall. Förutom vaccin mot koccidios (flock A2 och B2, se nedan) gavs inga andra vacciner till djuren.

Vid tre veckors ålder flyttades kycklingarna till mobila kycklinghus (Le Triangle, www.le-triangle.fr) på gräsvall (Fig.1). Kycklingarna fördelades på tre (gård A) respektive två (gård B) mobila hus utan tillskottsvärme, mekanisk ventilation eller artificiellt ljus. Klippt halm användes som strömedel på marken. Från och med cirka fyra veckors ålder fick djuren tillgång till utevistelse under dagtid. Dag (D)38, 39 eller 40 fördelades kycklingarna till ytterligare ett (gård A) respektive två (gård B) intilliggande hus för att ge djuren mer utrymme (Fig. 1). Samtliga kycklingar utfodrades med ekologiskt foder. Samma recept användes till flock 1 och 2 på samma gård. På gård A innehöll startfodret 24 % råprotein och gavs D1-14,

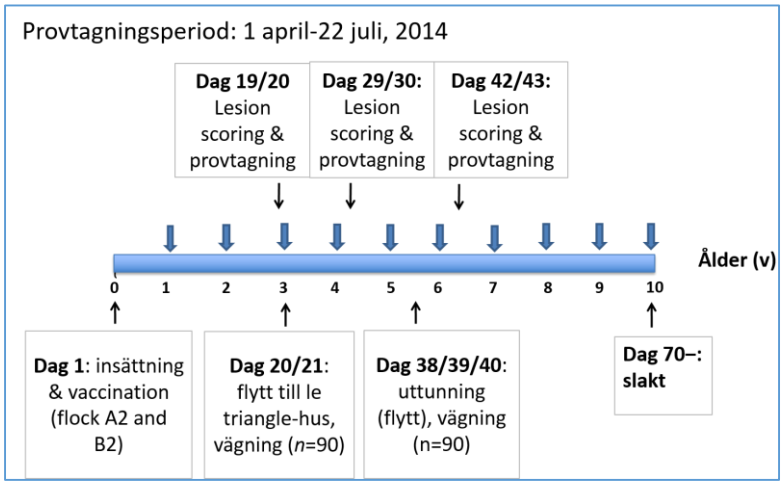
tillväxtfoder 1 (18 % råprotein) gavs från D15-28 och tillväxtfoder 2 (14 % råprotein) från D29 till slakt. Fodret var baserat på vete, havre och majs. Fiskmjöl (10 %) ingick i startfodret. På gård B utfodrades kycklingarna med startfoder (19,5 % råprotein) fram till och med D21. Från D22 gavs ett tillväxtfoder (23 % råprotein). Fodret kompletterades under första veckan med 100 kg fiskmjöl och från vecka 2 kompletterades fodret med ökande mängd gårdsproducerade råvaror (hackad ensilage, korn, havre, lupinfrö, solrosfrö, majs). Fodret gavs med fri tillgång. Grovfoder tillkom (bete, hö (A), ensilage (B)). Foderåtgång och foderutnyttjande (kg foder/kg tillväxt) kunde ej beräknas. Mellan flockarna högtrycktvättades startstallet på båda gårdarna. På gård A användes Virkon S som desinfektionsmedel och på gård B beströks golv och nedre delen av väggarna med en lösning av släckt kalk ($Ca(OH)_2$) och vatten. De mobila husen rengjordes med högtryckstvätt och flyttades mellan omgångarna.

Tillstånd: Djurförsöksetiskt tillstånd gavs av den regionala Djurförsöksetiska nämnden (M376-12 and M7-14), och tillstånd för klinisk läkemedelsprövning beviljades av Läkemedelsverket (5.1-2014-9625).

Klinisk övervakning: Under projektets gång övervakades försöksflockarna avseende klinisk sjukdom. Eventuella sjukdomssymtom och döda/ avlivade kycklingar registrerades. Sjuka/skadade kycklingar avlivades enligt gårdarnas normala rutiner.

Vaccination: Flock A2 och B2 vaccinerades med ett kommersiellt tillgängligt attenuerat vaccin mot koccidios på ankomstdagen. Vaccinet administrerades som spray på fodret enligt tillverkarens rekommendation. Vaccinet är avsett för slaktkycklingar och innehåller brådmogna oocystor av fyra koccidiearter; *E. acervulina* (stam HP, 500–650 oocystor/dos), *E. mitis* (stam HP, 1000-1300 oocystor/dos), *E. maxima* (stammarna CP and MFP, 200-260 and 100-130 oocystor/dos), samt *E. tenella* (stam HP, 500-650 oocystor/dos). Samma vaccinbatch användes på båda gårdarna och vaccinationen utfördes av samma veterinär.

Provtagning och laboratorieanalyser: Provtagningen utfördes enligt plan (Fig. 1).



Figur 1. Principskiss över provtagning i projektet.

Träckprov och parasitanalyser: Samlingsprov av träck togs en gång/vecka genom att brickor placerades på ströbädden över natt. Proverna poolades flockvis, blandades, och fyra underprover analyserades avseende antal oocystor/g träck (opg) med McMaster-metoden (detektionsgränsen 50 opg). DNA preparerades från prover innehållande oocystor och artbestämning utfördes med kvalitativ PCR avseende sju *Eimeria*-arter (Haug et al., 2007).

Lesion scoring (LS) och provtagning för mikroskopi: D20, 30 och 42 ±1 utfördes lesion scoring avseende slemhinneskador orsakade av koccidier och klostridier (20 kycklingar per tillfälle och flock). Följande publicerade och validerade undersökningsprotokoll användes:

- ✓ Lesion scoring för koccidier enligt Johnson & Reid, 1970.

- ✓ Lesion scoring för klostridieskador enligt Keyburn *et al*., 2006 med modifieringar enligt Shojadoost *et al*., 2012, respektive Lövland *et al*., 2004.
- ✓ Lesion scoring för muskelmagsskador enligt Kaldhusdal *et al*., 2012.

Hos samtliga kycklingar noterades även kroppsvikt, hull, kön, fothälsa, yttre skador och sjukliga förändringar. Ileuminnehåll sparades i frys (-20°C), blindtarm togs ut för klostridieräkning, och prov från tunntarm (duodenum, jejunum och ileum) togs för mikroskopisk undersökning. D42 togs prover från trakea för mikroskopi (n=5) samt 15 blodprov.

Vägning: I samband med flyttning av kycklingar från startstall till mobila hus och vid delning av flockarna D38-40 vägdes 90 slumpmässigt utvalda kycklingar/flock.

Klostridieräkning och PCR avseende netB-genen: Räkning av antalet CP i blindtarmen D20, 30 och 42 utfördes genom seriespädning av tarminnehåll och odling på selektiva medier. Från varje odlingspositivt prov renodlades ett till två isolat som sparades efter artkonfirmering med konventionella fenotypiska tester. Samtliga sparade isolat analyserades med PCR avseende *net*B-genen enligt Keyburn et al. (2008, med smärre modifieringar).

Serologi: Blodproverna analyserades avseende förekomst av antikroppar mot infektiöst bursitvirus (IBDV, Gumborosjuka), infektiöst kycklinganemivirus (CIAV, blåvingesjuka) och infektiöst bronkitvirus (IBV, infektis bronkit). IBDV och CIAV orsakar immunsuppression (riskfaktor för NE). IBV orsakar luftvägsinfektion och sänkt tillväxt.

Koccidiostikaanalys: Prover från alla inköpta foder utom fiskmjöl (gård B) analyserades avseende förekomst av jonoforkoccidiostatika (monensin, narasin och salinomycin).

Mätningar i djurmiljön: Omgivningstemperatur (°C) och relativ fuktighet (% RH) mättes i kycklinghöjd mitt i startavdelningen och i de mobila husen med hjälp av dataloggers (Tinytag Ultra2) var 30:e minut under uppfödningsperioden i samtliga fyra flockar.

Patologanatomisk diagnostik: Under uppfödningsperioden valdes en självdöd eller avlivad kyckling/flock slumpmässigt varje dag för obduktion. Kropparna obducerades på gårdarna eller på SVA av en fjäderfäpatolog. Sjukliga fynd, kroppsvikt, befjädring, förekomst av yttre skador och fothälsa noterades. Mikroskopi och bakteriologi utfördes vid behov.

Laboratorier och statistik: Analyser har utförts vid SVA utom PCR för artbestämning av koccidier, vilket gjordes vid Institutionen för Biomedicin och Veterinär folkhälsovetenskap, sektionen för parasitologi, SLU. Statistiska samband undersöktes med hjälp av Wilcoxon rank-sum test, Fishers's exact test, t-test samt med linjär regressions analys.

RESULTAT

Koccidier och koccidios: I Fig. 2 visas antal oocystor i träcken (opg, medianvärde, fyra underprover) vid provtagning en gång i veckan. I de båda ovaccinerade flockarna A1 och B1 detekterades de första oocystorna vid två veckors ålder och därefter följde ett bifasiskt infektionsförlopp. En första hög topp påvisades vid tre veckor (före flytt från starthuset) och arten *E. acervulina* påvisades med PCR i flock B1 (medianvärde 226,000 opg). Oocystorna från flock A1 (medianvärde 196,500 opg) vid denna ålder kunde ej identifieras. Den andra toppen i oocystutskiljning sågs i flock A1 vid fem veckor (medianvärde 18,000 opg) och arten *E. tenella* identifierades. Detta sammanföll med blindtarmskoccidios hos tre självdöda kycklingar vid 33-35 dagars ålder (Fig. 3). Därefter var oocystutskiljningen låg med oocystor av arterna *E. tenella*, *E. maxima* och *E. acervulina* ensamma eller i kombination. I flock B1, inträffade den andra toppen i vid sju veckor (medianvärde 112,000 opg). Detta sammanföll med dödsfall i tunntarms- och/eller blindtarmskoccidios hos nio självdöda kycklingar vid 43 till 54 dagars ålder (Fig. 4). Under perioden sex till tio veckors ålder påvisades oocystor av två till fyra arter vid varje provtagningstillfälle (*E. tenella*, *E. maxima*, *E. praecox* och *E. acervulina*). Vid den sista provtagningen påvisades även *E. necathrix.* Baserat på typen av

tarmskada och oocystornas storlek och lokalisationen i tarmen bedömdes *E. tenella* och *E. maxima* vara orsaken till dödsfallen i koccidios i flock B1.

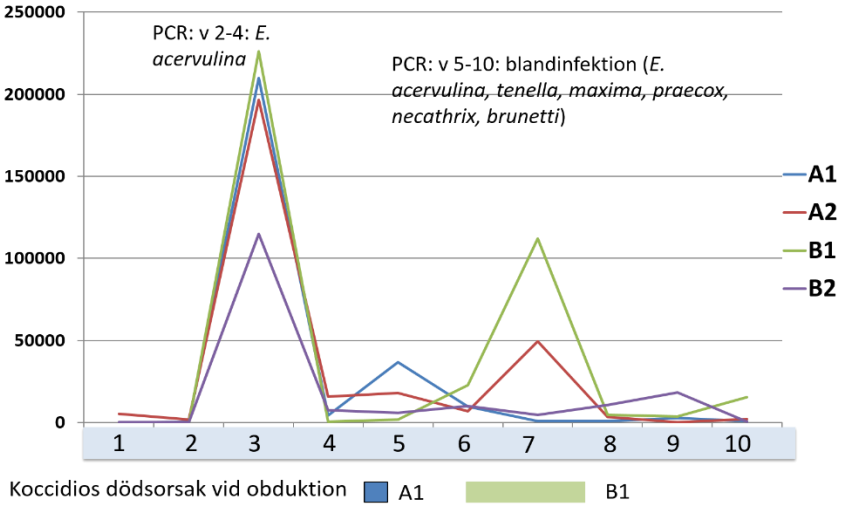


Fig. 2. Opg (antal oocystor per gram träck, medianvärde av fyra underprover, y-axel) över tid (vecka, x-axeln) från flock A1, A2, B1 och B2.

I de vaccinerade flockarna A2 och B2 påvisades ett litet antal oocystor vid en veckas ålder (sannolikt vaccinoocystor). I flock A2 sammanföll den första toppen i oocystutskiljning i såväl tid (tre veckor) som i antal oocystor (medianvärde 226,000 opg) med resultaten från flock A1. *E.* acervulina påvisades med PCR vid två-fyra veckors ålder. En andra topp i oocystutskiljning påvisades vid sju veckor (medianvärde 49 500 opg), det vill säga två veckor senare än i flock A1. Vid mellan fem och sju veckors ålder påvisades olika kombinationer av arter; *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox*, *E. brunetti* och *E. necathrix*. Därefter var antalet oocystor mycket lågt. I flock B2 sågs lägre oocystutskiljning vid tre veckor jämfört med övriga flockar (medianvärde 115 000 opg). *E. acervulina* och *E. tenella* påvisades. Oocystutskiljningen var därefter låg. Liksom i flock A2 påvisades olika kombinationer av *Eimeria*-arter (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necathrix*). Inga dödsfall till följd av koccidios diagnosticerades i flock A2 eller B2. Inga andra parasitägg påvisades.

Fig. 3. Akut blindtarmskoccidios (*E. tenella*) D34, flock A1.
Fig. 4. Akut tunntarmskoccidios D50, flock B1. Mikroskopisk undersökning påvisade riklig förekomst av oocystor och klostridieliknande bakterier.

Statistisk analys visade att på gård A fanns en signifikant skillnad ($p<0,05$) i opg mellan ovaccinerad och vaccinerad flock vecka 1, 4 och 8 (A2>A1) och vecka 9 (A1>A2). På gård B fanns en signifikans skillnad i opg vecka 1, 4, 5 (B2>B1) och vecka 6 (B1>B2). Orsaken till att vaccinerade kycklingar hade signifikant högre antal koccidier i träcken vid flera provtagningstillfällen var sannolikt att de var infekterade av både vaccin- och fältstammar.

***C. perfringens*/NE**: Antalet CP (log CFU/g blindtarmsinnehåll) D20, 30 och 42 (Fig. 5) var signifikant lägre hos kycklingarna på gård A jämfört med gård B oavsett vaccinationsstatus. Det fanns dock stora variationer mellan kycklingar i samma flock vid samma tidpunkt. Antalet CP var signifikant lägre hos vaccinerade fåglar på gård A, och samma tendens sågs på gård B. Ett oväntat fynd i studien var att en del kycklingar på gård B hade muskelmagserosion (slemhinnesår i muskelmagen). Statistisk analys visade att kycklingar med måttlig till kraftig skada hade högre antal CP i blindtarmen än kycklingar med inga/milda skador oberoende av kön, ålder och vaccinationsstatus.

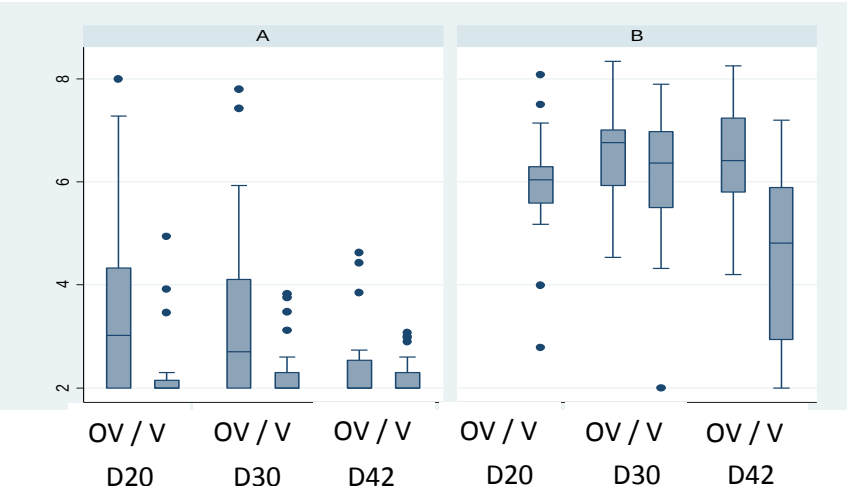


Fig. 5. Antal *C. perfringens* (log CFU) per gram blindtarms-innehåll. OV=ovaccinerad flock V=vaccinerad flock, D=dag. gård A till vänster och gård B till höger. (Data saknas för ovacccinerad flock B1 D20).

Påvisande av *netB*-genen hos CP

I Tabell 1 visas resultaten på fågel- respektive isolatnivå avseende toxingenen *netB* bland de 204 sparade CP-isolaten från detta projekt. Genen påvisades hos ett fåtal fåglar och isolat på gård B medan många isolat och fåglar från gård A, särskilt i flock A1 bar på denna gen.

Tabell 1. Resultat av PCR avseende *netB*-genen hos *C. perfringens*

Flock	*NetB*-positiva fåglar (*n*)	*NetB*-negativa fåglar (*n*)	*NetB*-positiva isolat (*n*)	*NetB*-negativa isolat (*n*)
A1	22	7	39	13
A2	2	14	4	24
B1	2	35	3	68
B2	5	48	7	99
Total	**31**	**104**	**53**	**204**

Lesion scoring (LS): I de ovaccinerade flockarna A1 och B1 påvisades tarmskador (lesion scores) till följd av koccidieangrepp av grad 1-2 (på en fyrgradig skala) i duodenum (*E. acervulina*) hos majoriteten av kycklingarna vid undersökning D19-20. Lesion scores av grad 1-2 påvisades i jejunum/ileum D29/30 hos de flesta kycklingarna. I blindtarmarna sågs tarmskador (grad 1) D30 i flock A1 hos 3/20 kycklingar, medan i flock B1 påvisades tarmskador (grad 1) i blindtarmen D43 hos 1/20 kycklingar (*E. tenella*). I de vaccinerade flockarna A2 och B2 sågs lesions scores av grad 1-3 i duodenum D19/20 (*E. acervulina*). Enstaka fåglar i båda flockarna hade lesions scores grad 1 i jejunum/ileum vid minst ett provtagningstillfälle. Blindtarmarna var utan anmärkning vid samma undersökningstillfällen.

Kroppsvikt: Vid 20 dagars ålder hade tuppkycklingar signifikant högre kroppsvikt än hönkycklingar (ca 64 g), vaccinerade kycklingar hade en signifikant lägre vikt än ovaccinerade, medan det inte fanns någon påvisbar skillnad beroende på grad av muskelmagskada. Vid 30 och 42 dagars ålder sågs ingen signifikant skillnad i vikt mellan könen eller vaccinationsstatus, men kycklingar med muskelmagskada hade signifikant lägre kroppsvikt än de utan skada. Vägning av 90 kycklingar i samband med flytt till mobila hus

(D20-21) och delning av flockarna D38-40 visade att kycklingarna var signifikant tyngre på gård A jämfört med gård B, och variationen var stor inom flockarna.

Tabell 2. Kroppsvikt (g, medelvärde±SD, *n*=90) hos kliniskt friska kycklingar gård A och B. Observera att det kan skilja 1-2 dagar i ålder.

	A1	**A2**	**B1**	**B2**
Vägning 1 (D20-21)	632±88 (D20)	639±88 (D20)	386±75 (D21)	335±75 (D21)
Vägning 2 (D38-40)	1463±231 (D38)	1480±286 (D39)	995±303 (D39)	1178±296 (D40)

Serologi: Antikroppar mot CIAV och IBDV påvisades hos enstaka kycklingar i samtliga flockar, medan och antikroppar mot IBV fanns hos kycklingar på gård A (Tabell 3).

Flock/virus	**IBDV**	**CIAV**	**IBV**
A1	1	3	6
A2	1	1	4
B1	8	1	0
B2	7	8	0

Tabell 3. Resultat av serologisk undersökning av blodprov från 15 kycklingar per flock. Siffrorna anger antal kycklingar med antikroppar.

Mikroskopi, tarm: Mikroskopisk undersökning av vävnadsprover från tarm (*n*=240 djur) tagna i samband med LS visade att majoriteten av djuren vid provtagning D20, 30 och 42 hade varierande grad av koccidieangrepp och inflammation i tunntarmen och/eller blindtarmen. I de vaccinerade flockarna utgjordes en del koccidier med stor sannolikhet av vaccinkoccidier, men dessa kan inte skiljas från fältstammar.

Mortalitet och obduktionsresultat

I Tabell 4 visas antalet självdöda, avlivade (på grund av sjukdom eller skada) och försvunna (antalet insatta minus antal slaktade) kycklingar under uppfödningsperioden. Totalt 276 självdöda eller avlivade kycklingar obducerades och mikroskopisk undersökning utfördes från 28 kycklingar för fastställande av diagnos. Flock A1 och B1 drabbades av förhöjd dödlighet under första levnadsveckan efter insättning till följd av bakteriell infektion (*E. coli*), vilket i stort sett förklarade den högre dödligheten i de ovaccinerade flockarna A1 och B1 (Tabell 3). Varken i flock A1 eller B1 sågs en tydligt ökad dödlighet under perioden då dödsfall i koccidios förekom. Olika diagnoser ställdes i de fyra flockarna. Bland annat påvisades bakteriella allmäninfektioner (*E. coli*, *Enterococcus* spp.), koccidios (se ovan), förstoppning i magtarmkanalen, tarminvagination, trauma (rovdjursangrepp, frakturer mm), sjukdomar i rörelseorganen (artrit/polyartrit orsakade av *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* och *Enterococcus* spp., snedställning av ben (varus/valgus), förlamning till följd av böld i ryggkota), och avmagring sannolikt till följd av muskelmagsår. Hos två kycklingar med koccidios sågs mikroskopiskt överväxt med klostridieliknande bakterier och tarmskador av den typ som ses vid NE. Vid obduktionerna och LS konstaterades att pododermatit (grad 1 eller 2) fanns hos en del kycklingar på båda gårdarna.

Tabell 4. Totalt antal döda, avlivade, och försvunna kycklingar D0-70. (*Siffror över antal saknade kycklingar saknades för gård B.*)

	Självdöda (n)	**Avlivade (n)**	**Försvunna**	**Totalt (n)**	**%**
A1	257	67	23	347	7,2
A2	136	87	17	240	5,0
B1	356	140	Okänt[1]	496	10,3
B2	227	196	Okänt[1]	423	8,8

Övrigt: Inomhustemperaturen i startstallet på båda gårdarna visade en gradvis sänkning från 33 till cirka 20°C med fluktuationer över dygnet inom några graders intervall. Den relativa fuktigheten i startstallet steg vartefter kycklingarna blev äldre, men fluktuationerna var

relativs små (cirka ±5%). I de mobila husen var både temperatur och relativ fuktighet mycket variabla. Ett uppmätta minimivärde på 4°C och ett maxvärde på nästan 42°C grader iakttogs. Temperaturskillnaden underdygnet varierade avsevärt (beroende på yttertemperaturen). Den relativa fuktigheten varierade mellan 30 och 95 % beroende på flock, datum och tid på dygnet. Koccidiostatika påvisades inte i något foderprov.

Avvikelser från ursprunglig plan: Analyser avseende näringsinnehåll i foder och jämförande tarmfloraundersökning utfördes ej.

DISKUSSION

Resultaten från detta projekt illustrerar väl komplexiteten i en fältsituation där samsjuklighet, uppfödningssätt, genetik, variation mellan individuella flockar mm samverkar och försvårar tolkningen av resultat. Man måste även ta hänsyn till att antalet undersökta flockar var lågt och att dessa flockar inte nödvändigtvis var representativa för hela populationen. Trots detta har projektet givit viktig information om tarmhälsan och identifierat faktorer som skulle kunna bidra till ytterligare förbättringar i ekologiska besättningar.

Resultaten bekräftade misstanken att koccidios kan utgöra ett problem vid ekologisk kycklinguppfödning i Sverige. De ovaccinerade kycklingarna drabbades av såväl subklinisk koccidios som dödsfall till följd av tunntarms- och blindtarmskoccidios. Koccidios var dock ingen dominerande dödsorsak, men man kan konstatera att det finns en risk för allvarligare utbrott framförallt senare under säsongen när oocystor anrikats i stallar och på bete, och när vädret är mer gynnsamt för parasitens sporulering. Å andra sidan bidrar sannolikt rutinerna på gårdarna med stallbyte, delning av flockar och flytt av mobila hus till att dämpa smittrycket och bryta smittcykeln. Tyvärr kunde inte betydelsen av subklinisk koccidios kvantifieras på grund av samsjuklighet och eftersom information om foderkonsumtion saknades, men det är rimligt att anta att sådana effekter även finns i ekologisk uppfödning. Koccidieangreppen höll sannolikt tillbaka tillväxten, bidrog till att flockarna blev ojämna och ökade foderåtgången. I en situation med uppfödning av mer långsamväxande fenotyp eller lägre pris för produkten kan sådana effekter komma att få ökad betydelse.

Hos konventionellt uppfödda kycklingar utgör *E. acervulina*, *E. maxima* och *E. tenella* de vanligaste och viktigaste *Eimeria*-arterna (Williams *et al*., 1996; Haug *et al*., 1998; Moraeus *et al*., 2015). Projektet bekräftade att samma arter dominerade hos de ekologiska kycklingarna, men att andra *Eimeria*-arter som oftast drabbar betydligt äldre kycklingar och unghöns, till exempel *E. necathrix* och *E. brunetti* också påvisades i slutet av uppfödningsperioden. Potentiellt kan även dessa arter utgöra ett hot mot djurhälsan eftersom ekologiska kycklingar slaktas senare än konventionella.

Ett bifasiskt oocystutskiljningsmönster (Fig. 2) påvisades i de ovaccinerade flockarna i vår studie, med en första topp redan vid tre veckors ålder och en andra vid fem respektive sju veckor. Den andra toppen sammanföll med dödsfall i blindtarms- och/eller tunntarmskoccidios. Hög och tidig oocystutskiljning vid tre veckors ålder konfirmerade tidigare resultat från kycklingar som inte fått koccidiostatika (Williams *et al*., 1996). Detta skiljer sig däremot från infektionsförloppet i flockar som får koccidiostatika där man som regel ser hög utskiljning vid fyra veckors ålder eller senare (Reyna *et al*., 1983; Williams *et al*., 1996). Den senare toppen i oocystutskiljning hos de ovaccinerade kycklingarna kan vara ett resultat av att smittcykeln temporärt brutits genom flytt. Många olika samverkande faktorer som smittryck i närmiljön, *Eimeria*-art, immunitet, andra sjukdomar, fåglarnas ålder och gårdarnas rutiner kommer att ha stor inverkan på utgången av en koccidieinfektion och infektionsförloppet kan därför skilja sig avsevärt mellan olika ekologiska gårdar.

Vaccination med ett kommersiellt tillgängligt attenuerat vaccin visade god effekt såtillvida att inga dödsfall i koccidios kunde påvisas i de vaccinerade flockarna. Tydliga effekter som ökad tillväxt, lägre spridning i kroppsvikt inom flockarna och lägre foderförbrukning/kg tillväxt kunde däremot inte bekräftas statistiskt. Orsaken är sannolikt att andra faktorer hade större betydelse i de undersökta flockarna, inte minst samsjuklighet. Man måste även ta hänsyn till att det var första gången vaccination utfördes. Upprepad vaccination över flera flockcykler skulle leda till att virulenta fältstammar åtminstone delvis skulle ersättas av attenuerade vaccinkoccidier, vilket på sikt innebär lägre smittryck och bättre tarmhälsa. Vaccination innebär dock en kostnad som måste vägas emot potentiella vinster genom minskad negativ effekt av subklinisk koccidios och färre dödsfall, men ytterligare studier krävs för att tydligt visa på en positiv effekt i fält. Det fanns även resultat som antyder att vaccination kan leda till lägre CP-tal, vilket eventuellt indirekt minskar risken för utbrott av NE. Man kan slutligen konstatera att vaccinet effektivt skyddade mot dödsfall i koccidios under rådande förhållanden, vilket starkt talar för att ekologiska kycklingar bör vaccineras rutinmässigt mot koccidios. Infektionsförloppet i de vaccinerade flockarna följde ungefär samma utskiljningsmönster som i en tidigare studie (William *et al*., 1999). Det fanns även indikationer på att kycklingarna på den ena gården (B) utvecklade bättre immunitet mot koccidioer tidigare än på den andra gården. Denna kan vara kopplat till skötseln av ströbädden eller andra faktorer. För att full immunitet ska utvecklas krävs att vaccinkoccidierna tillåts recirkulera mellan ströbädden och djuren flera gånger, och en farhåga är att flytten av kycklingarna vid tre veckors ålder bryter denna recirkulation i förtid. Trots detta visar vår studie att de vaccinerade kycklingarna utvecklade immunitet.

Trots närvaro av flera kända riskfaktorer (subklinisk koccidios, utfodring med spannmålsbaserat foder, fiskmjöl, temperaturstress och eventuellt infektion med immunsupprimerande virus) och förekomst av *netB*-positiva CP-stammar sågs inga tecken på subklinisk eller klinisk NE under projektperioden vare sig vid lesion scoring eller obduktion. Det enda undantaget var två kycklingar i flock B1 som sannolikt utvecklade NE sekundärt till akut tunntarmskoccidios. Det kan inte uteslutas att andra faktorer som långsam tillväxt och förhållandevis låg råproteinhalt i fodret minskade risken för NE. Ett mycket intressant resultat av studien var att kycklingarna på gård B hade så höga CP-tal att de löpte en påtaglig risk att utveckla NE ($>10^6$-10^8 CFU/g blindtarmsinnehåll). Situationen på gård A var det motsatta; antalet CP var lågt men *netB*-genen förekom hos en betydande andel av CP-stammarna. Projektet visar således att det kan finnas stora skillnader mellan flockar trots liknande uppfödningssätt. Det kan inte uteslutas att de höga CP-talen hos kycklingarna på gård B var kausalt kopplade till muskelmagserosioner som förekom hos kycklingarna på gård B, men det krävs fortsatta studier för att påvisa såväl orsaken till dessa skador samt effekter på tarmflora och tarmhälsa. Mycket talar dock för att muskelmagskador påverkar motiliteten i magtarmkanalen och digestionen negativt, och sammantaget kan dessa skador eventuellt kopplas till den lägre tillväxten hos kycklingarna på gård B.

PUBLIKATIONER

1) Kongressrapport (elektronisk poster) presenterad vid XIX World Veterinary Poultry Association Congress (WVPAC) i Kapstaden, Sydafrika, 7-11 september, 2015.
2) Vetenskaplig publicering i granskad tidskrift: ett manuskript om tarmhälsa kommer inom kort att skickas för publicering till en ”open access”-tidskrift.

SLUTSATSER OCH REKOMMENDATIONER

Baserat på resultaten rekommenderar vi vaccination mot koccidios i ekologisk kyckling-produktion. Vår studie visade att vaccination förebyggde dödsfall i koccidios. Med regelbunden vaccination över flera flockcykler finns en potential att förbättra tillväxten och minska variationen i kroppsvikt.

En annan viktig erfarenhet från projektet var att det finns ett betydande behov av rådgivning, veterinärkontakt och forskning rörande välfärd, hälsa och djurhållning i ekologisk kycklingproduktion. Det finns flera områden med förbättringspotential, till exempel tarm-, fot- och benhälsa. Inhysning i mobila hus kan vara en fördel ur smittspridningssynpunkt, men våra resultat visar att inomhusmiljön inte är optimal för djuren. Såväl temperatur som relativ fuktighet fluktuerade kraftigt under dygnet. Kyla är till exempel en känd riskfaktor för NE. Ett ökat smittryck i permanenta hus och på beten kan motverkas genom vaccination. Andra exempel på områden som behöver utredas mer är åtgärder mot rovdjur, val av genotyp, vaccinationssätt, ströbäddsskötsel, strömaterial, fodersammansättning, och införande av systematisk biosäkerhet. En aktiv dialog har förts med de deltagande djurägarna vilket lett till förändringar på båda gårdarna. Erfarenheter från projektet kommer även att användas i praktisk rådgivning och utbildning av övriga ekologiska kycklingproducenter i Sverige.

I ett större perspektiv bidrar projektet till ökad kunskap om bakterien *Clostridium perfringens* och nekrotiserande enterit. Denna sjukdom betraktas idag som en ”emerging disease” det vill säga en sjukdom som är på frammarsch i kommersiell kycklinguppfödning i Europa och Nordamerika. Sjukdomen har fått en ökad spridning och kan komma att bli ännu viktigare i framtiden. Resultaten i vår studie illustrerar väl hur komplex situationen kan vara med olika antal bakterier och varierande förekomst av *netB*-genen mellan individer, flockar och gårdar.

RESULTATFÖRMEDLING TILL LANTBRUKSSEKTORN

Resultatförmedlingen följer planen i ansökan, men är tyvärr försenad. Följande har gjorts:

Målgrupp allmänheten

- Projektet aviserades i Svensk Veterinärtidning och på SVA:s webbplats 2014.

Målgrupp fjäderfäbranschen

- Bakgrund, utförande och preliminära resultat redovisades vid SVA:s projektrådsmöte 2014.

Målgrupp KRAV och ekologiska lantbrukare

- En artikel i Ekologiskt lantbruk 2014 innehöll en kort intervju om projektet och resultat med projektledaren.

Kommande resultatredovisning

3) En artikel om småskalig och ekologisk kycklingproduktion och resultat från projektet planeras för publicering i Svensk Veterinärtidning (2016).
4) En populärvetenskaplig artikel för fjäderfäbranschen kommer att publiceras i branschtidningen Fjäderfä under 2016.
5) En populärvetenskaplig artikel för ekologiska producenter kommer att publiceras i branschtidningen Ekologiskt Lantbruk under 2016.

Ej genomfört enligt plan

- Nordic Poultry Meeting i Norge 2014 ställdes in. Vid mötet hösten 2015 kunde projektledaren inte delta på grund av tjänsteresa. Detsamma gällde Svensk Fågels stämma 2014 respektive 2015. Även mötet i Svensk Fågels djuromsorgsnämnd 2014 ställdes in.

ÖVRIG REDOVISNING

En delrapport har skickats till Läkemedelsverket i december 2014 eftersom projektet genomfördes som en klinisk läkemedelsprövning. Slutrapport kommer att skickas inom kort.

Referensgrupp: Följande personer har ingått i referensgruppen: Pia Gustafsson, veterinär för branschorganisationen Svensk Fågel, Johan Lindblad, tidigare veterinär för Svensk Fågel, Åsa Odelros, rådgivare för ekologisk fjäderfäproduktion, Paula Quintana Fernandez, KRAV.

Referenser för denna rapport kan fås på förfrågan.