

# Karakterisering av *Haemonchus* hos svenska får

Slutrapport: 06-11-16, Stiftelsen lantbruksforskning, projekt Dnr. 2003/157

Johan Höglund & Karin Troell, Avdelningen för parasitologi (SWEPAR), SVA/SLU

## Sammanfattning

Det övergripande syftet med projektet var att få kunskap om klimatologiska anpassningar hos den parasitiska rundmasken *Haemonchus contortus*. Projektet var uppdelat inom fyra delområden. Vi undersökte såväl maskens arttillhörighet som den populationsgenetiska strukturen hos maskisolat från samtliga befolkade världsdelar. Dessutom undersöktes klimateffekter på parasitens infektionsbiologi genom infektionsförsök både i fält och på stall. Maskar isolerade från får och get i Sverige artbestämdes till *H. contortus*. Det visade sig att populationsgenetisk struktur förelåg mellan ett tjugotal isolat varav flertalet från får. Ingående jämförande studier av fenotypiska uttryck visade på avsaknad av specifika evolutionära anpassningar till svenska klimatförhållanden. Det sammanfattande intrycket är att *H. contortus* uppvisar strukturerad genetisk variation och är en art med stor fenotypisk plasticitet. Detta bidrar till att masken kan överleva i de mest skiftande miljöer.

## Bakgrund

Den stora löpmagsmasken *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) är en högpatogen parasitisk rundmask hos får och get som sprids via larver på betet. Det är framför allt de icke immuna ungdjuren som drabbas av klinisk sjukdom och som kan dö av angreppen. De vuxna maskarna lever i värdjurets löpmage, där de livnär sig på att suga blod från slemhinnan. Infektionens svårighetsgrad är kopplat till antalet parasiter hos värdjuret. I värsta fall dör djuren till följd av blodbrist, men långt vanligare är de sub-kliniska förlusterna som avlöper utan att djuren visar tecken på sjukdom. Tillväxten hos djuren är dock ofta kraftigt nedsatt. Kontroll av *H. contortus* är följaktligen viktigt dels för att undvika att djuren utsätts för onödigt lidande, dels för att angreppen leder till produktionsförluster.

*Haemonchus* har en direkt livscykel med en fekal-oral smittväg. Detta innebär att larverna, som kläcks ur ägg på betet, äts upp tillsammans med betesgräset. Parasitens utveckling från ägg till infektiiv larv står under inflytande av temperatur och luftfuktighet. Det har visat sig att varmt och fuktigt klimat gynnar parasitens utveckling och överlevnad. Problem till följd av *H. contortus* är därför mest uttalade i regioner med ett tropiskt och/eller subtropiskt klimat. Parasiten orsakar dock sjukdom även i tempererade klimatområden. De skiftande klimatförhållanden som *Haemonchus* kan utsättas för i olika landområdet väckte två frågor: A) förekommer samma maskart globalt hos får och get? och B) uppvisar *Haemonchus* specifika anpassningar till skiftande klimatbetingelser?

Den senare frågan är av stor praktiskt betydelse för svensk fårhållning. Det finns nämligen tecken som tyder på att haemonchos är ett växande problem under svenska drift- och klimatförhållanden. Vid en inventering var cirka 37% av svenska ekologiskt producerade får var infekterade med parasiten (Lindqvist *et al.*, 2001). Det nordligaste fyndet gjordes i en besättning vid polcirkeln. Under projekttiden inkom även flera rapporter bland annat från en djurägare i Stockholmstrakten som förlorade hälften av sina får till följd av haemonchos. Detta illustrerar att angreppen kan vara mycket allvarliga även under svenska förhållanden.

Ändrade driftsformer inom ekologisk djurproduktion, som ju inte tillåter förebyggande avmaskningar kan vara en förklaring till att parasitens spridning gynnats under senare år. Det finns emellertid också en svensk rapport om att den stora löpmagsmasken hos får utvecklats

läkemedelsresistens mot avmaskningsmedel inom (pro)-bensimidazolgruppen som därmed är överksamma (Nilsson *et al.*, 1993).

Kännedom om olika faktorer som styr parasitens livscykel är viktigt för att effektivt motverka smittspridningen. Rätt tillämpad kan sådan kunskap användas till att förebygga sjukdomsutbrott. Exempelvis vid planläggning av beteshygieniska kontrollåtgärder är lokalt förankrad kunskap om de frilevande larvernans ekologi en förutsättning för att kunna lyckas.

## Resultat och diskussion

Arbetet baseras i första hand på information från detaljerade studier av två parasitisolat. Det ena isolerades från en fårbesättning i Sverige i slutet av 1990-talet, medan det andra importerades från kenyanska får vid ungefär samma tidpunkt. Dessa båda isolat, som fortfarande hålls i kultur vid SWEPAR, karakteriserades inledningsvis med olika molekylärgenetiska metoder. Dessutom genomfördes flera infektionsförsök såväl i fält som på stall, för att kartlägga klimatanpassningar genom att studera olika fenotypiska karaktärer hos parasiten.

### Genotypisk karaktärisering

#### *Parasitens arttillhörighet*

För att klarlägga släktskapet mellan *Haemonchus* från Kenya och Sverige, studerades maskarnas arttillhörighet med molekylärbiologiska tekniker. Med PCR-teknik förökades specifika delar av maskars arvsmassa varefter sekvensordningen hos PCR produkterna avlästes. Den samlade informationen användes sedan för att bedöma släktskapet mellan maskar av olika ursprung. I delstudien koncentrerades undersökningarna till den ribosomala DNA genen. Mellan de kodande sekvenserna i denna gen finns sekvenser som är variabla både hos *Haemonchus* och hos andra närbesläktade rundmaskar. Dessa sekvenser (ITS-1 och ITS-2) är de genetiska regioner som tidigare använts vid molekylära släktskapsstudier och för identifiering av parasitära rundmaskar på artnivå. Två metoder användes för att avläsa sekvenserna dels dideoxysekvensering, dels pyrosekvensering. Den senare metoden användes för att rationellt kunna inkludera ett stort antal maskindivider. Inom ramen för delstudien identifierades sammanlagt 110 maskar från svenska får, svensk get och kenyanska får. Resultaten visade att maskar från Kenya och Sverige var samma art eftersom endast obetydliga skillnader avlästes i ITS-1 och ITS-2 regionerna hos maskar med olika ursprung (Tabell 1). Den variation som noterades hos de olika isolaten, tolkades snarare som om de representerade olika populationer än att de var skilda arter (Troell *et al.*, 2003).

Tabell 1. Genotyper identifierade med Pyrosekvensering i ITS-1 hos *Haemonchus contortus*.

Genotyp (position 134,402)	Svenskt isolat får (n=40; %)	Kenyanskt isolat får (n=40; %)	Svenskt isolat get (n=30; %)
Insertion, C/C	90,0	0,0	73,3
Insertion, C/A	0,0	2,5	6,7
Ingen Insertion, C/C	10,0	15,0	20,0
Ingen Insertion, C/A	0,0	82,5	0,0

Dessutom isolerades en stor löpmagsmask från nötkreatur. Även denna individ undersöktes genom att sekvensera ITS-1 och ITS-2 med dideoxysekvensering. Vid en jämförelse med tillgängliga sekvenser i publika databaser, visade det sig att det var *H. placei*. Denna art är närbesläktad med *H. contortus* och förekommer i tropikerna, i första hand hos nötkreatur.

#### *Populationsgenetisk karakterisering*

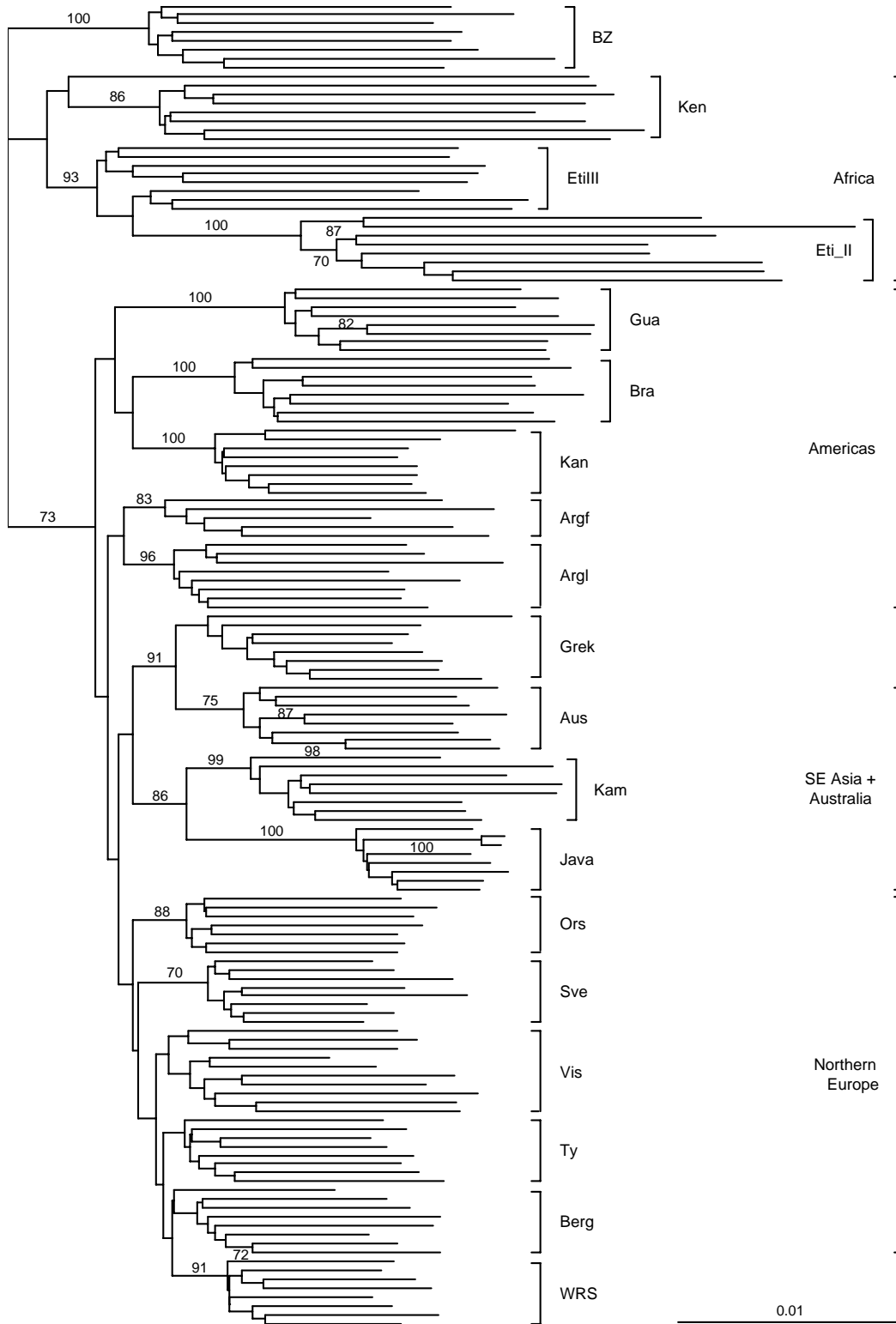
Tidigare studier har visat att *H. contortus* uppvisar obetydlig populationsstruktur beroende på ett stort genetiskt utbyte mellan olika sub-populationer (Blouin *et al.*, 1995). Som förklaringsmodell har angivits frekventa kontakter mellan besättningar till följd av djurförflyttningar som sker med människans hjälp. Det har också hävdats att maskisolat som regelbundet passerar genom värdjur under experimentella förhållanden kan förlora genetisk variation (Gasnier & Cabaret, 1998). Detta skulle i så fall kunna innebära att representativiteten hos våra laboratorieisolat kan ifrågasättas. För att undersöka den genetiska variationen mer storskaligt genomfördes en populationsgenetisk studie med maskisolat från samtliga befolkade kontinenter. Totalt inkluderades 150 maskindivider representerande 19 isolat, av vilka fyra kom från får av svenskt ursprung. De metoder som användes var: A) dideoxysekvensering av en mitokondriell gen, *nad4*, och B) ”amplified fragment length polymorphism” AFLP. Genen *nad4* har tidigare använts i liknande studier av den populationsgenetiska strukturen hos *H. contortus*, men även hos andra mer eller mindre närbesläktade parasitiska nematoder, och inkluderades därmed som referens. AFLP var däremot mer sällan använd som en populationsgenetisk markör. Vi hade dock kunskap om att metoden var en informationsrik markör hos lungmask (Höglund *et al.* 2004), varför vi beslutade oss för att använda AFLP även i detta sammanhang.

Den populationsgenetiska undersökningen visade till skillnad från tidigare studier att *H. contortus* uppvisade populationsgenetisk struktur, både på global nivå och mellan isolat inom Sverige, och alldeles oavsett om resultaten var baserade på AFLP eller *nad4* variation (Tabell 2). Studien avslöjade också att den genetiska variationen som avlästes såväl hos det kenyanska som hos det svenska isolatet, inte skiljde sig i förhållande till övriga fältisolat från respektive kontinent. Isolat från olika kontinenter grupperade tillsammans med varandra i den fylogenetiska analysen (Figur 1). Den slutsats som kan dras är att både det svenska och kenyanska isolatet är att betrakta som representativa för sina respektive ursprung (Troell *et al.*, 2006a).

Tabell 2. Genetisk struktur (Fst och Nst) från isolat studerade med AFLP och sekvensinformation från *nad4*

Isolat	Antal isolat i gruppen	AFLP Fst	<i>nad4</i> Nst
Alla isolat	19	0,18	0,57
Alla fält isolat	12	0,21	0,54
Alla labisolat	7	0,24	0,63
Svenska isolat	4	0,13	0,16

Figur 1. Orotat fylogenetiskt träd (minimum-evolution) baserat på AFLP data från 150 maskar representerande 19 isolat.



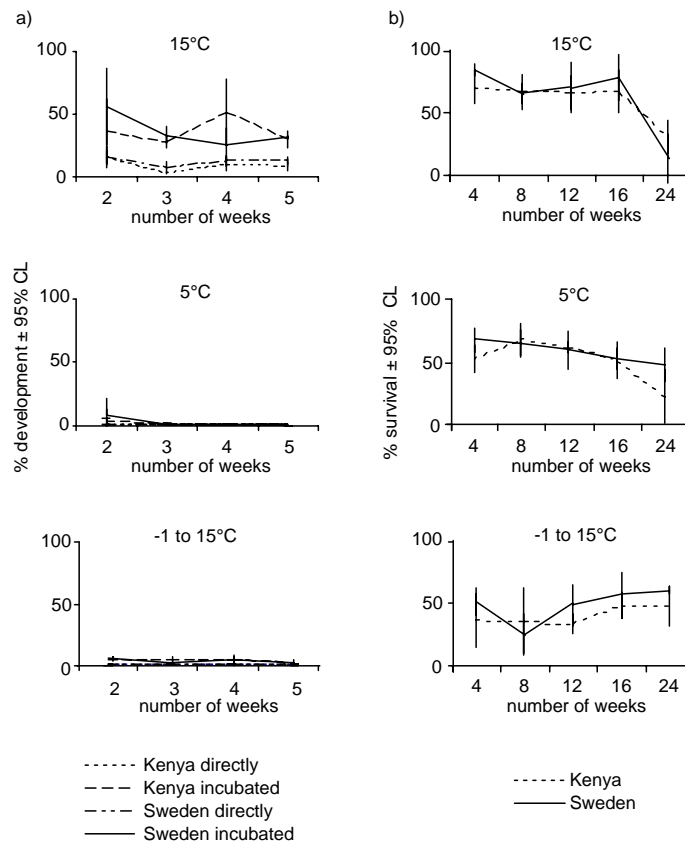
## Fenotypisk karaktärisering

### Klimatkammarstudier

Flera studier av parasitens externa livsstadier genomfördes under kontrollerade temperatur och fuktbedingungen i klimatkammare för att karakterisera de båda isolatens anpassningar till olika klimat. För ändamålet jämfördes åter de två laboratorieisolaten från Kenya och Sverige. Parasitäggets överlevnads- och utvecklingsförmåga studerades vid olika temperaturregimer, (vid 5°C, 15°C och när temperaturen fluktuerade dagligen mellan -1°C och 15°C). Även de infektiiva tredjestadie larvernas (L3) temperaturlösligheter jämfördes. Överlevnadsförmågan hos L3 som förvarades i vatten i cellodlingsflaskor vid ovan nämnda temperaturförhållanden kontrollerades regelbundet under närmare ett halvår.

Resultat från dessa studier visar att överlevnadsförmågan hos *H. contortus* från Sverige inte skiljde sig nämnvärt från maskarna från Kenya (Figur 2). Vår slutsats är att *Haemonchus* maskar från Sverige inte bär på någon unik förmåga att utvecklas och överleva under nordiska klimatförhållanden (Troell *et al.*, 2005).

Figur 2. Effekt av temperatur på utvecklings- och överlevnadstiden hos *Haemonchus contortus* ägg och infektiiva larver.



### Infektionsförsök på stall

Som tidigare nämnts visade den molekylärgenetiska undersökningen att svensk och kenyansk löpmagsmask var genetiskt åtskilda populationer. Ett infektionsförsök genomfördes följaktligen för att studera om dessa genetiska skillnader avspeglades i form av olika fenotypiska anpassningar, att betrakta som specifika anpassningar till svenska klimatförhållanden. Således undersöktes hos experimentellt inokulerade lamm såväl larvernas infektionsförmåga som deras benägenhet att gå i vila inuti värdjuret (hypobios). Vi jämförde även de båda isolatens prepatensperioder (tiden från

primärinfektion till påvisad äggutskiljning), och maskhonornas äggutskiljningsförmågor (fekunditet) som är intimt kopplad till de vuxna parasiternas kroppsstorlek och könsfördelning. Försöket var uppdelat i två försöksled med 12 parasitfria lamm infekterades: A) med färsk larver, och B) med larver som förvarats vid 5°C under nio månader. I båda försöksleden inokulerades olika lamm antingen med infektiösa larver av kenyanskt eller svenskt ursprung. Under försöken som pågick under fem veckor följdes äggutskiljningen med täta intervall. Vid försökets slut slaktades djuren och löpmagsinnehållet silades varefter fenotypiska karaktärer avlästes hos påträffade maskar.

Resultaten av infektionsförsöket visade att L3 var infektiösa även efter att ha varit utsatta för köldstress. Prepatensperioden och andelen larver som etablerades påverkades dock negativt av denna hantering (Tabell 3). Det var dock endast små skillnader mellan resultaten från de båda isolaten i respektive försöksled. Sammanfattningsvis visade infektionsförsöket att svensk och tropisk löpmagsmask betedde sig relativt likartat efter infektion av får som inokulerades med larver av olika ursprung, men förvarade under i identiska förhållanden. Detta visar att svenska maskar inte är specifikt genetiskt anpassade till tempererat klimat. Våra resultat tyder snarare på stor fenotypisk plasticitet, det vill säga att *Haemonchus contortus* är anpassningsbar och uppvisar stora toleranser till de mest skiftande klimatförhållanden (Troell *et al.*, 2006b).

### Övervintringsförsök

Sammanlagt fyra betesförsök genomfördes för att kartlägga övervintringsförmågan hos *H. contortus* i Sverige. Detta gjordes för att ta reda på om den allmänt utbredda uppfattning som finns om att de infektiösa larverna inte kan övervintra på betet under svenska klimatförhållanden stämmer (Waller *et al.*, 2006). Detta är en nyckelfråga av stor praktiskt betydelse vid anvisande av beteshygieniska åtgärder. Att ha kännedom om de frilevande larvstadierna överlevnadsförmåga på betet under vinterperioden är en förutsättning för att förstå om det sker en spridning av den betesburna parasitmittan år från år. Två av fältstudierna var tvååriga där får inokulerades med infektiösa larver, medan de resterande betesförsöken genomfördes på naturligt nedsmittade betesmarker (Troell *et al.*, 2005).

Tabell 3. Jämförelse av fenotypiska uttryck hos ett svenskt respektive kenyanskt isolat av *Haemonchus contortus* i samband med två experimentiella infektionsförsök

Isolate	Experiment	Establishment rate (%)	Male:Female ratio	Inhibition (%)	Prepatent period (days)	Worm lengths (cm)
All	1	71 <sup>p=0.0092</sup>	1.33 <sup>NS</sup>	60 <sup>NS</sup>	20 <sup>p&lt;0.001</sup>	2.23 <sup>NS</sup>
All	2	46	1.05	52	18	2.23
Sweden	1	74 <sup>NS</sup>	1.07 <sup>NS</sup>	56 <sup>NS</sup>	20 <sup>NS</sup>	2.18 <sup>NS</sup>
Kenya	1	67	1.64	65	20	2.27
Sweden	2	48 <sup>NS</sup>	1.01 <sup>NS</sup>	70 <sup>p=0.0104</sup>	19 <sup>p=0.025</sup>	2.21 <sup>NS</sup>
Kenya	2	43	1.09	36	18	2.24
Sweden	1 + 2	61 <sup>NS</sup>	1.04 <sup>NS</sup>	63 <sup>NS</sup>	19 <sup>NS</sup>	2.20 <sup>NS</sup>
Kenya	1 + 2	55	1.34	50	19	2.26

Sweden	1	74 <sup>NS</sup>	1.07 <sup>NS</sup>	56 <sup>NS</sup>	20 <sup>p=0.01</sup>	2.18 <sup>NS</sup>
Sweden	2	48	1.01	70	19	2.21
Kenya	1	67 <sup>p=0.03</sup>	1.64 <sup>NS</sup>	65 <sup>p=0.01</sup>	20 <sup>p=0.039</sup>	2.27 <sup>NS</sup>
Kenya	2	43	1.09	36	17	2.24

I studierna med experimentellt infekterade djur undersöktes: A) skillnader i övervintringsförmåga mellan svenska och kenyanska maskar och B) skillnader i överlevnadsförmågan hos maskar på betesmarker i centrala samt södra Sverige. Det första året släpptes experimentellt infekterade lamm i ett antal betesfällor för att kontaminera betesmarkerna med maskägg. Nästföljande år fastställdes larvernas övervintring genom att släppa ut s.k. spårlamm med uppgift att exponeras för och plocka upp eventuellt övervintrande smitta från föregående år. *H. contortus* återfanns etablerad hos spårddjur från samtliga beten. I motsats till detta återfanns smitta endast i ett fall hos ett spårlamm från ett naturligt infekterat bete. Denna smitta var dessutom låggradig.

Sammanfattningsvis visar dessa studier dels att *H. contortus* kan övervintra som larv på betet under svenska förhållanden, dels att det inte förelåg någon egentlig skillnad vad gäller de olika isolatens överlevnadsförmåga. Det bör dock betonas än en gång att den övervintrande smittan var låggradig. Det är dessutom ännu inte fastställt vilken praktisk epidemiologisk betydelse en övervintrad smitta har för *H. contortus* fortlevnad.

### Slutsatser

- Det studerade maskisolaten från Sverige och Kenya representerades av en och samma art, *H. contortus*, med olika individer som kan indelas i genetiskt åtskiljda populationer
- *Haemonchus* från svensk get var av samma art som hos från får
- *Haemonchus placei* dokumenterades för första gången hos svenska nötkreatur
- *H. contortus* uppvisade populationsstruktur, både globalt och inom Sverige
- Inga större skillnader i fenotypiska karaktärer mellan de svenska och kenyanska *H. contortus* isolaten noterades, dvs. tecken på specifika evolutionära anpassningar till det svenska tempererade klimatet hittades alltså inte
- Prepatensperioden påverkades negativt när larverna utsattes för långvarig köldstress innan inokulering, men detta gällde båda isolaten
- Det visade sig att *H. contortus* kan övervintra i Sverige som larv på betet, om än endast i ytterst begränsad omfattning varför den praktiska betydelsen av detta kan ifrågasättas

### Erkännaden

I ett flerårigt projekt har naturligtvis hjälp kommit från flera håll. Vi vill framför allt tacka våra medarbetare Jens Mattsson, Anders Alderborn, Annie Engström, David Morrisson, Cecilia Tingstedt. Dessutom riktas ett varmt tack till paret Gosselman, Daniel Brelin och familjen Sundbom för upplåtande av djur och betesmarker och annan praktisk hjälp.

### Referenser

Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H. & Dame, J.B. 1995. Host movements and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 141, 1007-1014.

- Gasnier, N. & Cabaret, J., 1998. Stable and unstable environments influence the genetic diversity of the nematode *Teladorsagia circumcincta*, a parasite of small ruminants. *Parasitology research* 84, 676-681.
- Höglund J., Engström, A., Morrison, D.A. & Mattsson J.G. (2004). Genetic diversity assessed by AFLP analysis of the parasitic nematode *Dictyocaulus viviparus* the lungworm of cattle. *International Journal for Parasitology*, 34, 475-484.
- Lindqvist, Å., Ljungström, B.L., Nilsson, O & Waller, P.J. 2001. The dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. *Acta veterinaria Scandinavica* 42, 377-389.
- Nilsson, o., Rudby-Martin, L., Lindqvist, Å. & Swan, O. 1993. Bensimidazol-resistenta *Haemonchus contortus* påvisade hos får i Sverige. *Svensk Veterinärtidning* 45, 303-307.
- Troell, K., Engström, A., Morrisson, D.A., Mattsson, J.G. & Höglund, J. 2006a. Global patterns reveal strong population structure in *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of domesticated ruminants. *International journal for parasitology* 36, 1305-1316.
- Troell, K., Mattsson, J.G., Alderborn, A. & Höglund, J. 2003. Pyrosequencing<sup>TM</sup> analysis identifies discrete populations of *Haemonchus contortus* from small ruminants. *International journal for parasitology* 33, 765-771.
- Troell, K., Tingstedt, C. & Höglund, J. 2006b. Phenotypic characterization of *Haemonchus contortus*: a study of isolates from Sweden and Kenya in experimentally infected sheep. *Parasitology*, 132, 403-409.
- Troell, K., Waller, P. & Höglund, J. 2005. The development and overwintering survival of free-living larvae of *Haemonchus contortus* in Sweden. *Journal of helminthology* 79, 373-379.
- Waller, P.J., Rydzik, A., Ljungström, B.L. & Törnquist, M. 2006. Towards the eradication of *Haemonchus contortus* from sheep flocks in Sweden. *Veterinary parasitology* 136, 367-372.

### Övrig publicering

- Höglund, J., Dimander, S.-O., Larsson, A., Troell, K., Waller, P. Uggla, A. 2005. Parasiter inom ekologisk djurhållning. Ekologiskt lantbruk, Ultuna, Uppsala, 22-23 november, 297.
- Tingstedt, C. 2003. Biological characterization of two isolates of *Haemonchus contortus*. MSc thesis, Swedish University of Agricultural Science.
- Troell, K. & Höglund, J. 2004. *Haemonchus contortus* i Sverige - här för att stanna. SUF Bladet, Stockholm Uppsala Fåravelsförening, 2: 11-14.
- Troell, K. & Höglund, J. 2005. The overwintering survival of *Haemonchus contortus* in Sweden. VH fakultetens forskningsdag.
- Troell, K. 2001. *Haemonchus* in small ruminants – one and the same? BSc thesis, Uppsala University.
- Troell, K. 2006. Genotypic and phenotypic characterization of *Haemonchus contortus* in Sweden. Doctoral thesis No. 2006: 36. faculty of Veterinary Medicine and Animal Health.
- Troell, K., Engström, A., Mattson, J. G. Höglund, J. 2003. Pyrosequencing analysis identifies discrete populations of *Haemonchus* from small ruminants, The 19th International Conference of the World Association for the Advancement in Veterinary Parasitology, New Orleans, USA



- Troell, K., Engström, A., Mattson, J. G. Höglund, J. 2005. The population genetic structure of *Haemonchus contortus* based on AFLP data. The 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Christchurch, New Zealand, 16-20 October, 92.
- Troell, K., Mattson, J. G. Höglund, J. 2001. A comparison of the rDNA internal transcribed spacers of *Haemonchus* in small ruminants. Scandinavian Society for Parasitology.
- Troell, K., Mattson, J. G. Höglund, J. 2002. Analysis of Genetic Markers in *Haemonchus* by Automated Real-Time Sequencing, Scottish Universities Molecular Parasitology Meeting
- Troell, K., Mattson, J. G. Höglund, J. 2002. Kartläggning av *Haemonchus* hos svenska idisslare Jordbrukskonferensen SLU.
- Troell, K., Mattson, J. G. Höglund, J. 2005. Differential Gene expression in cold-treated L3 larvae of *Haemonchus contortus*. COST action B16 WG 4.