

Slutrapport till SLU EkoForsk för projektet

Varför drabbas ekologiska värphöns av rödsjuka?

Projektansvarig: Professor Claes Fellström, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU

Övriga deltagare i projektet: Helena Eriksson, Doktorand, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU och Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) och Désirée Jansson Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA.

Bakgrund

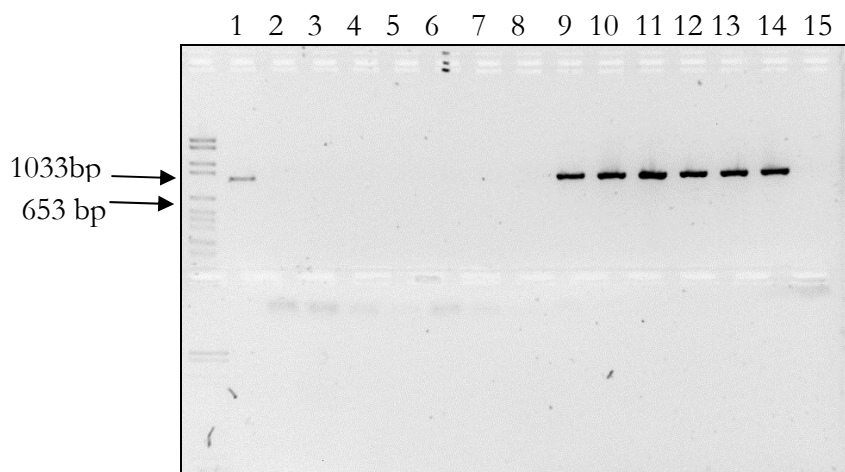
I värphönsfloccar som drabbas av sjukdomen rödsjuka ses hög dödlighet och sänkt äggproduktion. Sjukdomen orsakas av en infektion med bakterien *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Enligt svenska erfarenheter tenderar sjukdomen att vara vanligare i ekologiska värphönsbesättningar än i besättningar med frigående höns inomhus. Anledningen till detta har antagits vara ökade kontakter med potentiella smittkällor i den omgivande miljön vid utvistelse. Det har också antagits att rödsjukebakterier kan överleva länge i rastgårdar.

Det övergripande syftet med detta projekt har varit att få ökad kunskap om smittkällor för rödsjukebakterier. Målsättningen med försöken som finansierats via medel från SLU EkoForsk var att anpassa och utvärdera en PCR (Polymerase Chain Reaction) baserad metod för detektion av *Erysipelothrix rhusiopathiae*. PCR metoden har sedan använts för att undersöka prover tagna från potentiella smittkällor i ekologiska värphönsbesättningar. Inom projektet har också olika protokoll för DNA-extraktion från jord utvärderats genom undersökning av jord som blandats med *E. rhusiopathiae*-bakterier i olika koncentrationer.

I. Utveckling av PCR-system

Två olika PCR-system (Shimoji *et al.*, 1998; Yamazaki, 2006) har modifierats och testats mot isolat från SVAs stamförråd. Specificiteten i metoden har undersökts genom att inkludera förutom *E. rhusiopathiae* isolat från fjäderfä och andra djur även den närbesläktade, men för fjäderfä ej sjukdomsframkallande, *Erysipelothrix tonsillarum*. I samma syfte inkluderades också bakteriearter som är svåra att skilja från *E. rhusiopathiae* genom att de ger likartade symtom i fjäderfäfloccar, en liknande obduktionsbild och/eller likartade kolonier vid traditionell bakteriologisk odling.

Resultatet av detta arbete är två olika PCR-system användbara för undersökningar av provmaterial, ett som detekterar bakterier av genus *Erysipelothrix* (inklusive *E. tonsillarum*) (modifiering av Yamazaki, 2006) och en PCR som specifikt påvisar *E. rhusiopathiae* (baserad på Shimoji *et al.*, 1998) (Figur 1.) PCR-systemen har också potential för att kunna användas i generell rödsjukediagnostik för snabb, känslig och säker analys.



Figur 1. PCR resultat efter undersökning med modifierad Shimoji *et al.*(1998) av ett urval bakterieisolat. Bilden visar en agarosgel. Längst till vänster ses en storleksmarkör. Rad 1 *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC 19414/CCUG 221 (typstam), rad 2 *Erysipelothrix tonsillarum* ATCC 43339/CCUG 31352 (typstam), rad 3 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (typstam), rad 4 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (typstam), *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356/CCUG 5917 (typstam), rad 6 *Escherichia coli* ATCC 25922 (typstam), rad 7-8 *E. tonsillarum* (kliniska isolat), rad 9-14 *E. rhusiopathiae* (kliniska isolat, fjäderfä), rad 15 *Pasteurella multocida* CCUG 224 (typstam). För samtliga *E. rhusiopathiae* isolat ses ett band i storlek motsvarande 937 baspar. Övriga isolat uppvisar ingen PCR-produkt

II. Applikation av utvecklade PCR-system

a) Jordprover

Inför det delprojekt som syftade till att utvärdera protokoll för DNA-extraktion från jord blandades sandjord med buljong med hög respektive låg koncentration av *E. rhusiopathiae*. Tre olika metoder för DNA extraktion från jord testades:

- Nucleospin® Soil (Macherey-Nagel, Düren, Germany)
- PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, USA)
- PowerMax® Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, USA). Erhållet eluat koncentrerades också enligt tillverkarens instruktioner (PowerMax Konc.).

Även jord utan tillsatta bakterier undersöktes (blank). Samtliga prover preparerades i duplikat och därefter undersöktes de erhållna eluaten både ospädda och spädda 1:10 i PCR (modifierad Shimoji *et al.*, 1998). Som en jämförelse inkluderades PCR undersökning av koklysat från primärkulturer på selektiva odlingsmedier (inkubering i blåbuljong samt därefter utodling på hästblodagarplattor innehållande kanamycin (400 µg/ml) och neomycin (50 µg/ml) (KN-agar)).

Av resultaten, som finns sammanställda i tabell 1, kan utläsas att generellt erhöles positiva resultat vid undersökning av jord med hög koncentration av rödsjukesbakterier vid PCR undersökning av eluat erhållna efter DNA extraktion med samtliga de tre kit som testades i denna studie. Samtliga undersökningar av eluat erhållna vid DNA extraktion från jord med låg koncentration *E. rhusiopathiae* var dock negativa. Däremot var samtliga prover positiva vid undersökning med odling på selektiva medier och åtföljande PCR på primärkultur.

Prov	Spädning	Nucleospin	PowerSoil	PowerMax	PowerMax Konc.	Odling/koklysat
Hög 1	0	+	+	+	-	+
	1:10	+	-	+	+	+
Hög 2	0	+	+	+	+	+
	1:10	(+)	+	+	+	+
Låg 1	0	-	-	-	-	+
	1:10	-	-	-	-	+
Låg 2	0	-	-	-	-	+
	1:10	-	-	-	-	+
Blank 1	0	-	-	-	-	-
	1:10	-	-	-	-	-
Blank 2	0	-	-	-	-	-
	1:10	-	-	-	-	-
Neg ktrl	0	-	-	-	-	e.u

Tabell 1. PCR-resultat vid undersökning av eluat erhållna efter DNA-extraktion från jord med Nucleospin® Soil, PowerSoil® DNA Isolation Kit, PowerMax® Soil DNA Isolation Kit samt koklysat efter odling. Hög respektive låg koncentration av *E. rhusiopathiae* samt jord utan tillsatta bakterier (blank). Samtliga prover undersökta i duplikat samt eluaten undersökta ospädda och spädda 1:10 i PCR. e.u =ej utförd.

b) Fältprover

Medel från en annan finansiär (Ekhagastiftelsen) har finansierat provtagning i fyra ekologiska värphönsbesättningar med utbrott av rödsjuka och två friska ekologiska värphönsbesättningar (ej drabbade av rödsjuka). Exempel på material som samlats in är organ (tarm) från höns, organ från gnagare (svalg och tarm, två besättningar), sockprov (för undersökning av miljön), dammprov, jord från rastgården, gödsel från stack/binge, flugor och andra flygfän med mera. Totalt insamlades och sparades (i frys) 223 olika prover från dessa sex besättningar.



Figur 2. Jordprover i rastgårdarna togs med hjälp av ett så kallat tulpanjärn. Foto: Sigbrit Mattsson.

En jämförelse mellan diagnostik baserad på traditionell bakteriologisk odling kombinerat med biokemiska tester och PCR (modifierad Shimoji *et al.*, 1998) applicerad på primärkulturer från agarplattor gjordes och resultaten finns summerade i tabell 2. Odling utfördes på två olika typer av agarplattor, hästblodagar respektive hästblodagar med kanamycin (400 µg/ml) och neomycin (50 µg/ml) (KN-agar). Templat för PCR-undersökningen bereddes från samtliga agarplattor med synlig växt av bakterier (n=313). Positivt PCR-resultat erhöles från 28 primärkulturer motsvarande 22 prover. Av dessa 22 PCR-positiva prover var 19 st positiva för *Erysipelothrix rhusiopathiae* med konventionell odling/biokemisk diagnostik. Alla prover som

var positiva med traditionella metoder var också PCR-positiva. När PCR applicerades på primärkulturer från gödsel och dammprover så erhöles fler positiva svar från KN-agar än från hästblodagar (tabell 2).

För sex PCR-fragment utfördes DNA-sekvensering och resultaten konfirmerade att fragmenten verkligen kom från *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Sekvenserna, som har deponerats i GenBank var 890 nukleotider långa (GenBank accessionsnummer KC986835–986840). Fem nukleotidsekvenser (från gårdarna A och C) var identiska men skilde sig åt i tre positioner från den sjätte sekvensen från gård B och i fyra positioner från typstammen för *E. rhusiopathiae* (Fujisawa, GenBank acc. no. AP012027, gene ERH_0856). En av sekvenserna (från ett gödselprov från gård B) skilde sig i en position från typstammen. De fem aminosyrasekvenserna (gårdarna A och C) skilde sig i två positioner från typstammen medan den sjätte aminosyrasekvensen (gård B) var identisk med typstammen.

Prov	Hästblodagarplattor		KN-agar plattor	
	PCR	Odling	PCR	Odling
Vattenniappar	4/19	4/30	4/11	4/30
Gödsel	2/19	1/19	7/19	5/19
Damm från utsugsfläktar	0/15	0/15	3/14	2/15
Hönstarm	8/19	8/22	EU	EU

EU=Ej Undersökt

Tabell 2. Jämförelse mellan bakteriologisk odling/biokemisk identifiering och PCR applicerad på primärodlingar. Odling för *Erysipelothrix rhusiopathiae* utfördes med användning av icke-selektiva hästblodagarplattor och hästblodagarplattor med tillsats av kanamycin (400 pg/ml) och neomycin (50 pg/ml) (KN-agar). PCR utfördes inte på agarplattor utan någon synlig växt.

Viktiga resultat och slutsatser

- Två olika PCR-system användbara för undersökningar av provmaterial finns nu, ett som detekterar bakterier av genus *Erysipelothrix* (inklusive *E. tonsillarum*) (modifiering av Yamazaki, 2006) och en PCR som specifikt påvisar *E. rhusiopathiae* (baserad på Shimoji *et al.*, 1998).
- Delstudien som behandlade metoder för DNA-extraktion från jord indikerade att de tre kommersiella kit som testades hade lägre känslighet för påvisande av *E. rhusiopathiae* än PCR applicerad på primärkultur från selektiv odling.
- Vid undersökning av fältprover påvisades bakterien i prover från gödsel och damm från drabbade flockar. Risken för smittspridning via gödsel bedöms som större än via damm. Därför bör särskilda åtgärder vidtas vid hantering av gödsel från smittade flockar.

Tack vare medel beviljade från SLU EkoForsk har moderna diagnostiska system kunnat anpassas för användning på miljöprover för identifikation av *E. rhusiopathiae*. Sammanfattningsvis har projektet lett till ökad kunskap om smittvägar för rödsjuebakterier i ekologiska värphönsflockar, kunskap som är viktig för att förebygga och hantera framtida utbrott.

Resultatförmedling

Resultaten av undersökningarna som har finansierats via medel från SLU EkoForsk har redovistats i presentationer vid nationella och internationella konferenser, exempelvis World Veterinary Poultry Association, Nantes, Frankrike 2013, samt i en vetenskaplig artikel i tidskriften *Avian Pathology* (Eriksson H., Bagge E., Båverud V., Fellström C. & Jansson D.S. *Erysipelothrix rhusiopathiae* contamination in the poultry house environment during erysipelas outbreaks in organic laying hen flocks. *Avian Pathology* 2014, <http://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.1080/03079457.2014.907485>)

Referenser

Shimoji Y., Mori Y., Hyakutake K., Sekizaki T., Yokomizo Y. 1998. Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas. *J Clin Microbiol* 36:86-89.

Yamazaki Y. 2006. A multiplex polymerase chain reaction for discriminating *Erysipelothrix rhusiopathiae* from *Erysipelothrix tonsillarum*. *J Vet Diagn Invest* 18:384-387.