

Slutrapport för projekt ”Prövning av snabbtester för paratuberkulos på levande djur, II”

Dnr SLF: 149/02

SLF projnr: 0253007

Bakgrund

Paratuberkulos är en kronisk tarmsjukdom hos nötkreatur och andra idisslare, som orsakas av bakterien *Mycobacterium paratuberculosis*. Sjukdomen har ett långdraget, smygande förlopp och djuren kan vara infekterade i många år innan de visar några symtom. När sjukdomen väl har brutit ut sker ingen förbättring och behandling är verkningslös. Symtomen hos nötkreatur är avmagring och diarré, hos får vanligen endast avmagring. Paratuberkulos är en viktig sjukdom av flera skäl. Förutom att den ger ekonomiska förluster p.g.a. produktionsminskning, utslaktningen av infekterade djur, höga kostnader för tester och kontrollprogram har man hävdat att *M. paratuberculosis* kan vara en orsak till Crohn's sjukdom på människa. Det sistnämnda är dock mycket kontroversiellt.

Paratuberkulos är vanlig runt om i världen. Sverige är ett av de få länder som är fria (eller har mycket låg förekomst). Paratuberkulos betraktas i Sverige som en epizooti, vilket innebär att staten måste vidta åtgärder för att förhindra smittspridning och försöka utrota smittämnet. Efter att under flera decennier ansett oss fria från sjukdomen i Sverige, diagnosticerades den 1993 på importerade kött djur. Vid den survey av importdjur som följde och vid smittspårningar framkom ytterligare fall inom vissa av kött djursraserna. Risken för ytterligare spridning finns främst inom kött djursbesättningarna, eftersom importen inom mjölk raserna har varit mindre och några fall hos mjölk kor har hittills inte påträffats. Bästa sättet att förebygga spridning från eventuellt subkliniskt infekterade djur, som ej upptäckts vid importkontrollen eller från tidigare inhemsk smitta är att systematiskt kontrollera avelsbesättningarna under många år. Ett kontrollprogram mot paratuberkulos startades därför 1999 för avelsbesättningar inom kött raserna. Kontrollprogrammet drivs i Svenska Djurhälsovårdens regi med statliga medel.

Svårt att upptäcka sjukdomen. Det tar oftast flera år innan man ser några symtom vid paratuberkulos. Inkubationstiden är 6 månader - 6 år. Sjukdomsprocessen startar i bakre delen av tunntarmen och dess lymfknutor. Utskiljningen av bakterier i träcken kommer sent och är först oregelbunden och det tar alltså oftast flera år innan man kan påvisa bakterien i träckprover. När djuret väl visar symtom är bakterie-utskiljningen i regel riklig. Det säkraste sättet att avgöra om ett symtomfritt djur är infekterat med *M. paratuberculosis* är att vid slakt eller obduktion undersöka prover från tarmslemhinna och tarmlymfknutor från bakre delen av tunntarmen med odling.

Serologiska metoder är inte heller till hjälp för tidig upptäckt; antikroppsbildningen startar sent och antikroppar påvisas vanligen först efter att bakterieutskiljningen kommit igång. Det förekommer även en del falskt positiva reaktioner med serologiska tester. För att bekräfta serologiska reaktioner mot paratuberkulos, på ett säkert sätt, blir det ofta nödvändigt att slakta djuret och odla från tarm och lymfknutor. Att bekräfta en positiv serologisk reaktion är särskilt viktigt för smittämnen som medför stora konsekvenser när de påträffas, bl.a. de som orsakar epizootiska sjukdomar.

Det cellulära immunsvaret startar tidigt under infektionen och tester som påvisar detta ger tidigt positivt utslag. Tyvärr förekommer här mycket ofta falskt positiva reaktioner orsakade av närbesläktade bakterier.

För Kontrollprogrammet behöver man kunna ta prover från levande djur och tester för att påvisa smittämnet är hittills de enda som ger tillräcklig säkerhet. På senare år har man visat att *M. paratuberculosis* ibland också kan finnas i blod, mjölk och sperma och därför kan dessa provmaterial också vara av intresse. Det är ännu inte klarlagt när i infektionen och i vilken omfattning *M. paratuberculosis* kan påvisas i dessa typer av provmaterial. Det är dock troligt att förekomsten är låg och att känsliga analysmetoder därför behövs.

Material och metoder

PCR-metoder. En realtids-PCR som tidigare införts som rutinmetod, Willemsen's PCR (PCR W), utnyttjar IS900-genen hos *M paratuberculosis*. Realtids-PCR utförs i slutna kärl, vilket minskar risken för laboratoriesmitta. Reaktionsprodukten i PCR-reaktionen detekteras med en fluorescerande prob, som kan avläsas i realtid och kvantitativ mätning kan utföras.

Två alternativa realtidsPCR-system (DH1 och DH2), som utnyttjar andra delar av IS900-genen har utvecklats. Ytterligare ett realtidsPCR-system har utvecklats. Det utnyttjar F57-genen, som också anses vara specifik för *M paratuberculosis*, och är därmed ett helt oberoende system.

I samtliga tillämpningar används rutinmässigt realtids-PCR W och de alternativa realtids-PCR-systemen, DH1, DH2 och F57, används för att konfirmera, när rutin-PCR är positiv.

Sperma-PCR. Processad sperma spikades med känd mängd *M paratuberculosis*. Mängdbestämningen utfördes genom bakterieräkning i Bürker-kammare med mikroskop. Sperma från olika tjurar och olika spädningar av sperman testades. Proven behandlades med lyseringsbuffert och bead-beating och DNA extraherades med fenol och kloroform. PCR W, enligt ovan, användes för detektion. (Herthnek et al. In press)

Direkt PCR på träckprover. Förbehandlingsprotokollet för träckprover innefattade lysering och bead-beating. Lysatet renades med ett modifierat QIAamp protokoll (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen).

Sensitiviteten prövades på träckprover spikade med känd mängd *M paratuberculosis*. Metoden provades parallellt med odling på infrysta ringtestprover från USA och från Tjeckien och på svenska träck- och tarmprover som inte varit frysta före odling.

Resultat

PCR-metoder för konfirmering. De två alternativa PCR-systemen DH1 och DH2 reagerar inte på mykobakteriestammen 2333, som ger korsreaktion i de flesta tidigare PCR-system riktade mot IS900-genen, inklusive vårt rutinmässigt använda PCR-system W. En stam av *Mycobacterium avium* subsp *avium* gav en svag reaktion med PCR DH1 och en *Mycobacterium* spec, troligen en ny art, reagerade med DH2. Samtliga *M paratuberculosis*-stammar gav bra reaktion i DH1 och DH2.

Det nu utvecklade realtidsPCR-systemet för F57-genen blev positivt för samtliga 100 testade *M paratuberculosis*-stammar, men gav ingen reaktion med någon av de andra mykobakterie-stammarna.

De nya realtidsPCR-systemen provades också i sin tillämpning att konfirmera paraTB-prover som blivit positiva i direkt-test med PCR W. Med PCR DH1 och DH2 blev samtliga positiva, som reagerat i PCR W. Med PCR F57 blev 40 av 41 positiva. Det prov som inte reagerade i PCR F57 var bland de prover som hade en mycket svag reaktion med PCR W, DH1 och DH2. (Publikation 2 och 4)

Sperma-PCR. Realtids-PCR mot IS900-genen detekterade ner till 10 organismer per prov om 100 µl sperma. Eventuell PCR-hämning kunde detekteras med hjälp av en

internkontroll. Ingen PCR-hämning sågs av sperma om den var spädd åtminstone 1:2 med Triladyl. (Publikation 1,3 och 5)

Direkt PCR på träckprover. Med QIAamp-kitet kunde de flesta träckproverna renas tillräckligt bra för att undvika hämning av PCR-reaktionen. Testens känslighet prövades först med artificiellt infekterade prover. PCR-testen kunde detektera ner till 10^4 bakterier/g träck. Odling på flytande odlingsmedier kunde också påvisa ner till 10^4 bakterier/g träck, men vid odling på fasta medier endast ner till 10^6 bakterier/g.

Vid jämförelsen med odling på ringtestprover, som varit frysta, detekterade PCR-testen och odlingen båda korrekt 26 av 31 möjliga positiva prover. Inget falskt positivt resultat noterades. Vid jämförelse av PCR och odling från färska svenska prover blev 3 positiva med PCR och 4 med odling.

Diskussion

PCR-metoder för konfirmering. Den rutinmässigt använda PCR-metoden, som påvisar en del av IS900-genen hos paratuberkulosbakterien är inte fullständigt specifik, utan kan i enstaka fall reagera med liknande gener hos närbesläktade bakterier (Englund et al. FEMS Microbiol. Lett. 2002, 209, 261-265). Man måste därför alltid konfirmera en positiv PCR för paratuberkulos. Vid odling, när man har isolerat en stam av *M paratuberculosis* kan man konfirmera med olika tester på isolatet, men om man utför PCR-testen direkt på provet måste man konfirmera med en annan lika känslig detektionsmetod. Det kan vara en annan oberoende PCR, som t ex är riktad mot en annan gen hos bakterien. Vi har tidigare tagit fram en konfirmerande PCR, som utnyttjar en annan specifik gen (F57) hos paratuberkulosbakterien. När vi införde den känsligare realtidsPCR-metodiken måste vi dock utveckla ny konfirmerande test, som var lika känslig. Vi har därför utvecklat två alternativa realtids-PCR mot andra delar av IS900-genen. Dessa alternativ har lika hög känslighet som PCR W och vi har därför kunnat konfirmera med dessa i samtliga fall där PCR W blivit positiv vid test direkt på provmaterialet. För att ha en helt oberoende känslig konfirmerande test har vi också utvecklat en realtids-PCR mot F57-genen. Denna test har en betydligt bättre känslighet än motsvarande i konventionell PCR, men något lägre än de tester som är baserade på IS900-genen, vilket är förklarligt med tanke på att IS900-genen förekommer i ca 18 kopior hos bakterien, men F57-genen endast i 1 kopia. I praktisk användning av realtids-PCR F57 för konfirmering har vi dock kunnat kompensera för detta genom att vid behov testa flera replikat av provet. På så sätt har vi i de flesta fall lyckats konfirmera även svagt positiva prov med PCR F57.

Vi har därmed tillgång till säkra konfirmerande metoder även när vi använder realtids-PCR direkt på provmaterialet för att påvisa *M paratuberculosis*, vilket är mycket viktigt i Sverige där ett påvisat nytt fall av paratuberkulos får mycket allvarliga konsekvenser. Beskrivning och prövning av våra konfirmerande PCR finns i manuskript för publicering i internationell vetenskaplig tidskrift (4).

Sperma-PCR. Det är inte visat att paratuberkulos kan överföras via sperma och risken att sprida sjukdomen via insemination bedöms vara mycket lägre än när man köper in en tjur till besättningen. Man bör dock ändå kontrollera att sperman inte kommer från en tjur med paratuberkulos. Det sker bäst genom att testa tjuren, eller helst hela besättningen där tjuren finns, med upprepade träckprovstagningar. Eftersom detta ofta inte är praktiskt möjligt krävs i regel endast en serologisk testning av tjuren. Serologisk testning har mycket låg sensitivitet och det kan därför vara ett bra alternativ att testa sperman direkt avseende förekomst av paratuberkulosbakterier. Realtids-PCR är en känslig metod för att påvisa *M paratuberculosis* i tjursperma. Lysis med mekanisk sönderdelning följt av fenol/kloroform-extraktion är effektivt för att isolera DNA och ta bort PCR-inhibitorer. Ner till 10 paratuberkulosbakterier per spermastrå kan påvisas.

Direkt PCR på träckprover. Den förbehandlingsmetod som användes vid provpreparationen har gett tillfredsställande rening av provet, så att endast ett fåtal prover visat hämning av PCR-reaktionen. PCR och odling visade samma känslighet vid jämförelse på ringtestprover och på artificiellt infekterade prover. Vid jämförelsen på ringtestproverna, som varit frysta innan de analyserades, blir odlingsmetoden missgynnad eftersom ca. 90 % av bakterierna dör vid en nedfrysning och upptining. PCR-resultatet påverkas däremot mycket lite av att proverna varit nedfrysta. På de få färskt positiva prover som varit tillgängliga att analysera blev 4 positiva med odling och 3 med PCR. Dessa resultat tyder på att PCR-metodens känslighet inte är mycket lägre än odlingsmetoden. Direkt-PCR kan nu användas på prover från misstänkta fall för att ge snabbt preliminär svar samtidigt som proverna också odlas med konventionell metod. Det är nu också möjligt att använda direkt-PCR för att analysera prover i kontrollprogrammet som inte kunnat bedömas i odlingen på en övertaxerad. Detta ger besparingar i både tid och pengar när det förekommer övertaxerade prover i en besättning. Innan man kan bedöma om PCR kan ersätta den långsamma odlingsmetoden i fler situationer måste ytterligare validering på ett större antal färskt prover utföras.

Publikationer

1. Herthnek D, Englund S, Willemsen PTJ & Bölske G (2004) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. 1st International qPCR Symposium & Application Workshop, 3-6 March, 2004, Freising-Weihenstephan, Germany, Abstract, p.13.
2. Herthnek D & Bölske, G. (2005) Real-time PCR-systems for confirming direct detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 2005, Abstract, p. 104
3. Herthnek D, Englund S, Willemsen PTJ & Bölske G (2005) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 2005, Abstract, p. 104.
4. Herthnek D & Bölske G (200x) Real-time PCR systems for confirming PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Manuscript)
5. Herthnek D, Englund S, Willemsen P & Bölske G (2006) Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* (In press)
6. Herthnek D & Bölske G (200x) Real-Time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine clinical samples. (Manuscript)

Övrig resultatförmedling till näringen.

- Göran Bölske informerar om PCR-utveckling för paratuberkulos vid möte med Svenska Djurhälsovården och Svensk Mjolk på SVA, 2003-05-09
- Göran Bölske informerar om diagnostikutveckling för paratuberkulos innefattande detta projekt vid möte med Svenska Djurhälsovården, Svensk Mjolk, Jordbruksverket och SVA på Svensk Mjolk i Stockholm, 2003-11-03
- David Herthnek informerar om projektet vid möte med Svenska Djurhälsovården och Svensk Mjolk på SVA, 2004-03-10.
- Göran Bölske informerar om PCR-diagnostikens tillförlitlighet och införande i diagnostiken vid möte med Svenska Djurhälsovården, Svensk Mjolk och Jordbruksverket på SVA, 2004-10-28.