

Slutrapport till Stiftelsen Lantbruksforskning projekt 137012

1. Sammanfattning av våra resultat
2. Bakgrund
3. *Delstudie I*: Bakterieförekomst och samband med produktionsform
4. *Delstudie II*: Besättningsutredningar i smittade flockar
5. *Delstudie III*: Insamling av tarmspiroketer från vilda fåglar och andra misstänkta smittbärare
6. *Delstudie IV*: Molekylärbiologisk studie av spiroketer från studie I-III
7. *Delstudie V*: Patogenitetsstudier i en etablerad djurmodell.
8. Diskussion
9. Egna publikationer och planerad publicering



Bild 1. Elektronmikroskopisk bild av *Brachyspira*-bakterier i blindtarmen hos en svensk värphöna (ursprunglig förstoring 2000 gånger). Foto: Tapio Nikkilä, SLU

1. Sammanfattning av våra resultat

- Bland svenska värphöns är *Brachyspira*-infektion vanligt förekommande. På flocknivå är infektionen vanligare i KRAV-an slutna flockar (71 %) än i flockar i inredd bur, envånings- eller flervåningsssystem (25-31 %). Utevistelse utgör en viktig riskfaktor. Besättningar med fler än en separat avdelning eller flera höns hus löper signifikant ökad risk för infektion.
- Hygienbarriär och anslutning till det frivilliga salmonellakontrollprogrammet minskar risken för *Brachyspira*-infektion.
- *Brachyspira*-infektion kunde i vår studie tydligt kopplas till sänkt äggproduktion. Dock kunde inget statistiskt samband med smutsägg påvisas i vårt material. Detta kan bero på att det finns andra orsaker till smutsägg som kan ha interfererat med analysen, på att vi inte tagit hänsyn till vilken/vilka arter som påvisats och/eller att begreppet smutsägg definieras olika av producenterna. Fortsatt analys av data pågår.
- Hos svenska värphöns förekommer alla de *Brachyspira*-arter som tidigare har rapporterats från andra länder bland värphöns. En art som är mycket vanlig i vissa länder förefaller dock vara påtagligt mindre vanlig i Sverige (*B. pilosicoli*) än i till exempel Australien och USA. Dessutom har vi påvisat flera genetiska varianter av *Brachyspira*-bakterier, som troligen representerar hittills okända arter. Betydelsen av dessa arter är i dagsläget okänd.
- Vi har kunnat visa att ett biokemiskt typningsschema, som ursprungligen utarbetades för diagnostik av *Brachyspira*-bakterier hos gris, är användbart för *Brachyspira*-bakterier från fåglar, förutom för arterna *B. alvinipulli* och "*B. pulli*" inte kan särskiljas från övriga arter. Vi har påbörjat utveckling av en ny diagnostisk metod för *B. alvinipulli* eftersom denna art är kliniskt betydelsefull och underskattad avseende förekomst.
- Vi har visat att kloner av *Brachyspira*-bakterier kan finnas på en värphönsanläggning under lång tid (år) trots rengöring, desinfektion, hygien- och smittskyddsåtgärder. Exakt hur spridningen mellan flockarna på en anläggning sker är oklart. Indirekt smitta via skor, kläder redskap och smitta via gnagare misstänks kunna sprida bakterierna.
- Vidare har vi som första forskargrupp i världen kunnat visa att *Brachyspira*-floran hos tamhöns har hög genetisk diversitet. Inom en flock och hos enskilda fåglar, kan infektion med flera arter eller kloner finnas samtidigt. Detta försvårar diagnostiken och gör att utredning av epidemiologi och produktionsstörningar försvåras.

- *Brachyspira*-bakterier av samma arter som kan påvisas hos värphöns, förekommer mycket ofta bland hobbyhöns och andra icke-kommersiella fjäderfän och bland viltuppfödda raphöns, fasaner och gräsänder. Hobbyfjäderfän och viltuppfödda fåglar bör därför inte hållas på gårdar med värphöns eller avelshöns. Viltuppfödda fåglar som släpps från hägn kan utgöra en potentiell reservoar i naturen för *Brachyspira*-bakterier.
- En samlad, större underökning av förekomst av *Brachyspira*-bakterier hos vilda fåglar har för första gången genomförts. Våra resultat visar att *Brachyspira*-bakterier förekommer hos vilda fåglar, särskilt bland andfåglar och kråkfåglar medan infektion inte har kunnat påvisas bland de flesta övriga undersökta fågelordningar. Vilda andfåglar kan vara infekterade med i stort sett samtliga kända arter. Hos kråkfåglar dominerar en hittills okänd art som vi har karaktäriserat. Kråkfåglar utgör sannolikt en obetydlig smittrisk för tamhöns och gris.
- Hägnade och vilda gräsänder kan vara infekterade och troligen även sprida *B. hyodysenteriae* (svindysenteribakterier) och en genetiskt närbesläktad variant. De senare kan infektera och orsaka diarré hos gris. En infektionsmodell för undersökning av smittvägar och patogen förmåga har utarbetats och testats i praktiken. Våra resultat talar för att gräsänder kan vara en potentiell smittkälla för grisbesättningar.
- Slutligen har vi visat att *Brachyspira*-bakterier kan infektera änder via kloaken. Denna smittväg har aldrig tidigare påvisats för *Brachyspira*-bakterier och fyndet kan ha epidemiologisk betydelse.

2. Bakgrund

Brachyspira-bakterier bildar tillsammans med ytterligare ett knappt 100-tal bakteriearter en egen utvecklingsgren bland bakterierna; fylum *Spirochaetes* (i dagligt tal spiroketer). Spiroketer är spiralvridna, rörliga bakterier som ofta är svårödlade på laboratoriet. Sju arter har hittills beskrivits inom släktet (genus) *Brachyspira*, och ytterligare tre arter har rapporterats preliminärt (tabell 1).

Tabell 1. Arter inom släktet *Brachyspira*.

Art	Typ/referensstam	Värdjur	Sjukdom
<i>B. aalborgi</i>	513A ^T	Människa	Intestinal spiroketos
<i>B. alvinipulli</i>	C1 ^T	Tamhöns	Tarminflammation, produktionsstörning
" <i>B. canis</i> " ¹	A2 ^R	Hund	Ej rapporterat
<i>B. hyodysenteriae</i>	B78 ^T	Gris	Svindysenteri
" <i>B. ibaraki</i> " ¹	HIS24/11/99 ^R	Människa	Ej rapporterat
<i>B. innocens</i>	B256 ^T	Gris, tamhöns	Ej rapporterat
<i>B. intermedia</i>	PWS/A ^T	Gris, tamhöns	Tarminflammation, produktionsstörning (tamhöns)
<i>B. murdochii</i>	56-150 ^T	Gris, tamhöns	Ej rapporterat
<i>B. pilosicoli</i>	P43/6/78 ^T	Gris, fåglar, människa mfl	Spiroketal diarré (gris) Tarminflammation, produktionsstörning (tamhöns)
" <i>B. pulli</i> " ¹	Ej definierad	Tamhöns	Produktionsstörning? (ej slutgiltigt klarlagt)

¹Namnen på arterna "*B. canis*", "*B. ibaraki*" och "*B. pulli*" har ännu inte godkänts officiellt.

Den mest kända och studerade arten inom släktet är *Brachyspira* (*B.*) *hyodysenteriae*, som orsakar den mycket allvarliga diarrésjukdomen svindysenteri hos växande grisar (trivialnamn svindysenteribakterier). *B. pilosicoli*, som orsakar diarré och nedsatt tillväxt hos gris och produktionsstörning hos värphöns, misstänks kunna överföras mellan olika djurarter, inklusive från djur till människa (zoonos). I dagsläget är det inte slutgiltigt klarlagt om *Brachyspira*-bakterier (*B. aalborgi*, "*B. ibaraki*", *B. pilosicoli*) kan orsaka sjukdom hos människor. På slutet av 1980-talet upptäckte man av en slump i Nederländerna att *Brachyspira*-bakterier även kan infektera tamhöns. Idag är det känt att tre olika arter (*B. alvinipulli*, *B. intermedia* och *B. pilosicoli*) kan orsaka tarminflammation, diarré, smutsägg och sänkt äggproduktion hos värphöns och avelshöns, samt

nedsatt tillväxt hos avkomman till infekterade avelsdjur. Ytterligare några *Brachyspira*-arter kan infektera tamhöns (*B. innocens*, *B. murdochii*, ”*B. pulli*”). Dessa arter är ej sjukdomsframkallande, eller har ännu inte visats kunna orsaka tarminflammation och/eller produktionsstörning.

Brachyspira-infektion hos tamhöns är hittills bara rapporterat bland tamhöns från ett fåtal länder t.ex. Australien, Nederländerna, Sverige och USA och utgör med största sannolikhet ett kraftigt underskattat problem. Målet med vårt forskningsprojekt var att i detalj kartlägga förekomsten av *Brachyspira*-bakterier i svenska värphönsbesättningar och hos andra fåglar som kan utgöra en reservoar. Använda metoder är bland annat obduktion, ljusmikroskopi, faskontrastmikroskopi, transmissionselektronmikroskopi, bakteriologisk isolering, biokemiska tester, molekylärbioologisk karaktärisering (PCR, RAPD, PFGE, 16S rDNA-sekvensering) och experimentell infektion.

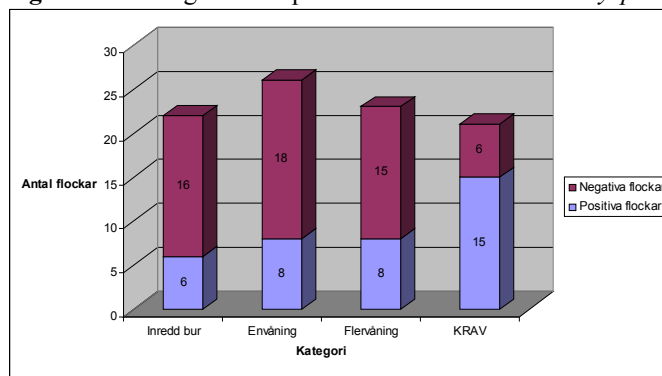
3. Delstudie I: Bakterieförekomst och samband med produktionsform (värphöns)

Syfte: Att kartlägga förekomst och artsammansättning av *Brachyspira*-bakterier bland svenska värphöns, och att med statistisk metodik studera riskfaktorer och konsekvenser av infektionen.

Material och metoder: Urvalet av flockar för provtagning baserades på tillgängliga register hos Statens jordbruksverk och KRAV. Icke-kommersiella värphönsbesättningar och hönsflockar i konventionell bur uteslöts. Urvalet skedde obundet slumpmässigt. Kategoriindelning baserades på inhysningssätt (inredd bur, envåningssystem, flervåningssystem och KRAV-anslutna flockar). Provtagningen (20 träckprov) utfördes en gång per flock vid 60 till 65 veckors ålder. Samtliga primärisolat undersöktes biokemiskt. Från alla odlingspositiva flockar sparades ett urval isolat. Primärisolat med olika biokemiska mönster valdes ut för molekylärbioologisk karaktärisering. Statistisk analys gjordes på isoleringsresultaten och på uppgifter om flockarna som hade samlats in i samband med provtagningen. Analys skedde med chi²-test och t-test för kontinuerliga variabler (logistiskt regressionsmodell, univariat analys). Multivariat analys utfördes på riskfaktorer som var statistiskt signifikanta ($p < 0.05$) i den första analysen.

Resultat isolering och statistisk analys: Prov analyserades från 92 hönsflockar. Totalt antal insatta höns i provflockarna var drygt 732 000. *Brachyspira*-bakterier påvisades i 37 av 92 flockar. Resultatet fördelat på inhysningssätt visas i figur 1. Procentandelen infekterade flockar var: inredd bur 27 %, envåningssystem 31 %, flervåningssystem 25 % och KRAV-anslutna flockar 71 %.

Figur 1. Isoleringsresultat på flocknivå avseende *Brachyspira*-bakterier fördelat på inhysningssätt.



Skillnaden i *Brachyspira*-förekomst mellan KRAV-anslutna flockar och övriga flockar var statistiskt signifikant. En stark riskfaktor för infektion var utevistelse (sex gånger högre risk för KRAV-anslutna flockar eller flockar i envåningssystem som hade vistats utomhus i rastgård eller på bete före provtagningen). Även antalet positiva prover inom flockarna skiljde sig signifikant beroende på inhysningssätt. En större andel av de 20 proverna var odlingspositiva i flockar som vistades på golv än de som hölls i inredd bur. Detta beror sannolikt på att smittspridningen sker mer effektivt bland frigående höns än i inredd bur. Vidare påvisades en tio gånger förhöjd risk för *Brachyspira*-infektion om fler än en separat värphönsavdelning/hus fanns på samma gård jämfört med gårdar som bara hade ett höns hus. En möjlig förklaring kan vara att hönsen i de olika avdelningarna/husen på samma gård ofta har olika åldrar. Detta betyder att det alltid finns lämpliga

värddjur tillgängliga, och smittan kan spridas mellan flockarna. På gårdar med bara ett hus kommer detta att stå tomt en tid efter att hönsen har slaktats, och smittan måste etableras på nytt till varje ny flock. Även vid multivariat analys (då man samtidigt tar hänsyn till flera parametrar) var sambandet mellan flera avdelningar och bakterieförekomst starkt. Ingen statistiskt säkerställd skillnad i *Brachyspira*-förekomst kunde påvisas mellan olika hönshybrider.

Riskanalys avseende möjliga smittkällor genomfördes. I den statistiska analysen kunde inget säkerställt samband mellan *Brachyspira*-infektion och olika vattenkällor påvisas. Två av flockarna drack sjövattnet. Båda dessa flockar var infekterade av *Brachyspira*-bakterier. Någon statistik riskvärdering kunde inte genomföras eftersom besättningarna var för få, men sjövattnet bör betraktas som en risk (*Brachyspira*-bakterier, liksom vissa andra patogena smittämnen, kan påvisas i ytvatten). Andra husdjur på gården medförde ingen statistiskt påvisbar risk. Statistisk analys av gnagare och vilda fåglar som riskfaktor kunde ej genomföras på grund av för få mätpunkter. Statistisk värdering av smittskydd i relation till *Brachyspira*-förekomst utfördes. Risken för infektion var halverad för flockar som var anslutna till det frivilliga salmonellakontrollprogrammet, vilket tyder på att etablerade hygienrutiner och smittskyddsåtgärder minskar risken för infektion. Detta stöds av att flockar utan hygiengräns vid ingången löpte fem gånger högre risk för infektion jämfört med flockar med hygienbarriär. Vid multivariat analys föll utevistelse ut som en av de viktigaste riskfaktorerna för *Brachyspira*-infektion. Detta talat för att smittreservoaren finns i omgivningen och att smittskydd och hygienrutiner på anläggningarna är av stor vikt.

Dödlighet från insättning till provtagningen (60 till 65 veckors ålder) analyserades i relation till hybrid, inhysningssätt och förekomst av *Brachyspira*. Dödligheten vid denna ålder varierade med inhysningssätt (inredd bur 6 %, envåning 11 %, flervåning 13 %, KRAV-anslutna flockar 9 %). Ingen signifikant skillnad i dödlighet påvisades i relation till *Brachyspira*-infektion. Förekomst av smutsägg förekom mest i envåningssystem. Däremot kunde statistiskt korrelation med *Brachyspira*-infektion inte fastställas i vårt material. Sådant samband har påvisats i andra studier vid fältundersökning och experimentell infektion. Avsaknad av samband kan bero på att andra orsaker till smutsägg kan ha påverkat analysen, att vi inte tagit hänsyn till *Brachyspira*-art, eller att producenterna uppfattat begreppet olika. Äggproduktionen, mätt som värp% vid provtagningen, var högre i inredd bur (82 %) än i övriga kategorier (78-79 %). Vid den multivariata analysen sågs ett tydligt samband mellan sänkt äggproduktion och *Brachyspira*-infektion.

4. Delstudie II: Besättningsutredningar i smittade flockar (värphöns)

Syfte: Att identifiera *Brachyspira*-infekterade värphönsbesättningar och i dessa genomföra detaljerade studier av bakterier, tarmhälsa och infektionsförlopp.

Material och metoder: Värphönsflockar med *Brachyspira*-infektion identifierades. Flockarna undersöktes genom bakteriologisk provtagning (isolering, renodling, biokemisk karaktärisering), obduktion och mikroskopisk undersökning. Diagnostik för att utesluta andra orsaker till störningarna har genomförts i varierande omfattning. Totalt 12 flockar ingår i undersökningen. Merparten av besättningarna har genomgått upprepad provtagning under ett till fyra år. Karaktärisering av renodlade *Brachyspira*-kloner har genomförts med biokemisk typning, PCR, RAPD och 16S rDNA-sekvensering.

Resultat: Våra resultat visade att flera *Brachyspira*-arter samtidigt kan förekomma i en smittad flock och på en anläggning. Samma klon kan finnas kvar i en och samma flock under lång tid. Flocken förblir i regel infekterad resten av produktionsperioden. På anläggningar med flera olika avdelningar/hus, kan samma klon ibland påvisas i flera olika hus och under flera på varandra följande produktionsomgångar. I vissa fall kan identiska eller närbesläktade kloner påvisas under flera år i samma besättning. Det finns också exempel på att en klon helt försvinner i samband med att hönsen slaktas. I efterföljande flock kan då helt nya kloner eller arter påvisas.

En av de mest intressanta besättningsutredningarna genomfördes i en stor värphönsbesättning. Besättningen hade frigående höns i två olika inhysningssystem (envåning och flervåning), och långvariga problem med smutsägg (10-15 %) och sänkt äggproduktion. Andra orsaker än

Brachyspira-infektion kunde uteslutas. Som orsak till problemen påvisades *B. intermedia* av två olika kloner i de två huskomplexen på anläggningen och *B. pilosicoli* i ett huskomplex. Ytterligare två *Brachyspira*-arter påvisades, varav den ena fanns i båda huskomplexen. Smittspridning mellan husen misstänktes ske med gnagare eller möjligen indirekt via skötare. Saneringsförsök genomfördes efter planerad slakt av en del av hönsen. Nya smittskyddsrutiner infördes och unghönsen som sattes in var smittfria. Efter sex veckor på anläggningen var de nya hönsen infekterade av *Brachyspira*-bakterier. Provtagning för *Brachyspira*-bakterier hos möss pågår.

5. Delstudie III: Insamling av tarmspiroketer från vilda fåglar och andra misstänkta smittbärare

Syfte: att kartlägga förekomsten av och karaktärisera *Brachyspira*-bakterier hos potentiella smittbärare, i första hand hobbyfjäderfä, hägnade viltfåglar och viltlevande fåglar.

Viltuppfödning/hägnade viltfåglar: I Sverige föds fåglar av arterna raphhöns, fasan och gräsand upp i hägn för utsättning till jakt och för att stödja den viltlevande populationen. Inför projektstarten hade en svensk studie visat att viltuppfödda fåglar ofta är infekterade av *Brachyspira*-bakterier (Jansson *et al.*, 2000; Jansson *et al.*, 2001), vilket sannolikt kan förklaras genom att uppfödningen sker under former som gynnar smittspridning av fekalt överförda smittämnen. Dessutom kan viltuppfödda fåglar ses som en potentiell reservoar i naturen eftersom de släpps i stort antal under sommar och höst.

Material och metoder: Kompletterande provtagning har utförts.

Resultat: 102 av totalt 115 prover från viltuppfödda fåglar var positiva avseende *Brachyspira* spp. Drygt 90 primärisolat tillvaratogs för forskning.

Vilda fåglar

Material och metoder: Kunskap om förekomsten bland vilda fåglar är viktig för att bedöma smittrisker för fjäderfä och grisbesättningar. Vår studie är den första samlade undersökningen av *Brachyspira*-förekomst bland vilda fåglar. Totalt samlades knappt 600 prov från 47 fågelarter av sju ordningar in från olika delar av landet. I tabellerna 3-9 redovisas provtagna fågelarter. Analyser återstår att genomföra i en del fall (ej redovisade i tabellerna). Förutom svenska vilda fåglar har, i samarbete med en forskargrupp från Umeå Universitet, provtagning gjorts på Sydpolen i en pingvinkoloni.

Resultat: I tabell 3-9 redovisas isoleringsresultaten av *Brachyspira*-bakterier från de undersökta vilda fåglarna. Resultaten visade att *Brachyspira*-bakterier förekommer bland vilda fåglar, men att förekomsten är ojämnt fördelad mellan olika ordningar och mellan arter inom ordningarna. De ordningar som oftast förefaller vara infekterade är andfåglar och kråkfåglar. *Brachyspira*-bakterier påvisades inte bland pingviner, men däremot hos en annan fågelart som lever i pingvinkolonier (slidnäbb). Sammantaget visar våra undersökningar att *Brachyspira*-bakterier finns ojämnt spridda i den vilda avifaunan, sannolikt med stor geografisk spridning, och att vissa vilda fåglar kan utgöra potentiella smittbärare för husdjur. Orsaken till den stora skillnaden i *Brachyspira*-förekomst mellan olika fågelarter är okänd. Faktorer som kan påverka förekomsten skulle till exempel kunna vara diet, olika levnadsmiljöer och levnadssätt eller fysiologiska skillnader.

Tabell 3. Ordning Andfåglar (*Anseriformes*)

Familj	Fågelart	Latinskt namn	Antal fåglar	Antal positiva	% positiva
Andfåglar	Prutgås	<i>Branta bernicla</i>	5	0	0
	Vitkindad gås	<i>Branta leucopsis</i>	6	2	33
	Grågås	<i>Anser anser</i>	4	3	75
	Sångsvan	<i>Cygnus cygnus</i>	2	2	100
	Knölsvan	<i>Cygnus olor</i>	6	4	67
	Kricka	<i>Anas crecca</i>	1	0	0

	Bläsand	<i>Anas Penelope</i>	5	2	40
	Gräsand	<i>Anas platyrhynchos</i>	217	169	78
	Ejder	<i>Somateria molissima</i>	23	16	70
	Alfågel	<i>Clangula hyemalis</i>	3	3	100
	Småskrake	<i>Mergus serrator</i>	1	1	100
TOTALT			273	202	74

Tabell 4. Ordning rovfåglar (*Falconiformes*)

Familj	Art	Latinskt namn	Antal fåglar	Antal positiva	% positiva
Hökartade rov- Fåglar	Ormvråk	<i>Buteo buteo</i>	1	0	0
	Sparvhök	<i>Accipiter nicus</i>	1	0	0
TOTALT			2	0	0

Tabell 5. Ordning tranfåglar (*Gruiformes*)

Familj	Art	Latinskt namn	Antal fåglar	Antal positiva	% positiva
Tranor	Trana	<i>Grus grus</i>	2	0	0
Rallar	Sothöna	<i>Fulica atra</i>	1	1	100
TOTALT			3	1	33

Tabell 6. Ordning hönsfåglar (*Galliformes*)

Familj	Art	Latinskt namn	Antal fåglar	Antal positiva	% positiva
Skogshöns	Dalripa	<i>Lagopus lagopus</i>	11	0	0
TOTALT			11	0	0

Tabell 7. Ordning vadarefåglar (*Charadriiformes*)

Familj	Art	Latinskt namn	Antal fåglar	Antal positiva	% positiva
Snäppor	Rödspov	<i>Limosa limosa</i>	9	0	0
	Brushane	<i>Philomachus pugnax</i>	15	5	33
Måsfåglar	Skrattmåås	<i>Larus ridibundus</i>	20	0	0
	Fiskmåås	<i>Larus canus</i>	2	0	0
	Gråtrut	<i>Larus argentatus</i>	10	0	0
	Havstrut	<i>Larus marinus</i>	4	0	0
TOTALT			60	5	8

Tabell 8. Ordning duvfåglar (*Columbiformes*)

Familj	Art	Latinskt namn	Antal fåglar	Antal positiva	% positiva
Duvor	”Stadsduva”	<i>Columba livia</i>	3	0	0
	Ringduva	<i>Columba palumbus</i>	1	0	0
TOTALT			4	0	0

Tabell 9. Ordning tättingar (*Passeriformes*)

Familj	Art	Latinskt namn	Antal fåglar	Antal positiva	% positiva
Ärlor/piplärkor	Sädesärla	<i>Motacilla alba</i>	2	0	0
	Trädpiplärka	<i>Anthus trivialis</i>	1	0	0
Järnsparvar	Järnsparv	<i>Prunella modularis</i>	1	0	0
Trastar, sångare, & flugsnappare	Björktrast	<i>Turdus pilaris</i>	2	0	0
	Koltrast	<i>Turdus merula</i>	5	1	20
	Taltrast	<i>Turdus philomelos</i>	6	1	17
	Grönsångare	<i>Psylloscopus sibilatrix</i>	1	0	0
	Lövsångare	<i>Psylloscopus trochilus</i>	1	0	0
	Törnsångare	<i>Sylvia communis</i>	1	0	0
	Årtsångare	<i>Sylvia curruca</i>	1	0	0
	Rödstjärt	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	3	0	0
	Rödhake	<i>Erithacus rubecula</i>	4	0	0
	Blåhake	<i>Luscinia svecica</i>	2	0	0
Finkfåglar	Svarthätta	<i>Sylvia atricapilla</i>	1	0	0
	Stenknäck	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	3	0	0
	Bergfink	<i>Fringilla montifringilla</i>	2	0	0
	Grönfink	<i>Chloris chloris</i>	1	0	0
	Gråsiska	<i>Carduelis flammea</i>	1	0	0

	Gråsparv	<i>Passer domesticus</i>	3	0	0
Kråkfåglar	Kaja	<i>Corvus monedula</i>	37	11	30
	Kråka	<i>Corvus corone cornix</i>	65	18	28
	Råka	<i>Corvus frugilegus</i>	17	5	29
	Korp	<i>Corvus corax</i>	3	0	0
TOTALT			163	36	22

Övriga fjäderfän, övriga fåglar och gnagare

Brachyspira-bakterier har samlats in från hobbyfjäderfä (icke-kommersiella tamhöns, tamankor, tamgäss, myskankor, löpänder, kalkoner) och strutsfåglar. *Brachyspira*-bakterier har påvisats i nästan samtliga besättningar bland hönsfåglar och andfåglar samt i lägre grad hos strutsfåglar. Isolaten har artbestämts tentativt genom biokemisk undersökning. Flera av de arter som är sjukdomsframkallande för höns har preliminärt påvisats. Hobbyfjäderfän måste därför betraktas som en potentiell smittkälla för värphönsbesättningar.

Försök har gjorts i samband med detta projekt att fånga vilda gnagare på värphönsanläggningar för *Brachyspira*-analys, tyvärr utan större framgång. Helt nyligen har vi dock fått tillgång till ett sätt att fånga levande gnagare. Ett nytt doktorandprojekt har därför nyligen påbörjats på SLU för att studera gnagarnas roll som vektorer. Provtagning av gnagare har nu påbörjats även i en värphönsbesättning med omfattande problem till följd av *B. intermedia* (se delprojekt II).

6. Delstudie IV: Molekylärbiologisk studie av spiroketer från studie I-III

Syfte: Att med molekylärbiologiska metoder karaktärisera *Brachyspira*-bakterier från fåglar.

Värphöns

Material och metoder: Utvalda isolat från delstudie I undersöktes med fem olika PCR-system för att påvisa arterna *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* och *B. intermedia*, samt 16s rDNA sekvensering.

Resultat: När 16S rDNA-sekvensering av utvalda isolat påbörjades visade det sig att en stor andel av primärisolaten bestod av två eller fler olika *Brachyspira*-arter eller olika kloner av samma art. Mycket omfattande arbete fick därför läggas på att renodla och undersöka kloner. Sekvensering av klonerna från delstudie I visade att *B. intermedia* fanns i åtta av 37 infekterade flockar (22 %) och *B. alvinipulli* i minst tre flockar (8 %). *B. alvinipulli* hade före denna studie endast påvisats i en värphönsflock i USA och hos enstaka hundar i Sverige och Norge. Vidare påvisades arten ”*B. pulli*” som tidigare bara har rapporterats från enstaka värphönsflockar i Australien baserat på molekylärbiologiska studier. Vidare förekom enstaka isolat av två helt nya genetiska varianter som tidigare inte har beskrivits. Båda kan representera okända *Brachyspira*-arter. Den kliniska betydelsen är oklar i dessa fall. Övriga isolat tillhörde arterna *B. innocens* och *B. murdochii*. Vid jämförelse mellan biokemiskt mönster hos isolerade bakterier och sekvensdata fanns god överensstämmelse med två undantag. I dagsläget kan biokemisk metodik inte säkert skilja *B. alvinipulli* och ”*B. pulli*” från övriga arter. I samband med utredningar riskerar man då att inte kunna påvisa (minst) en kliniskt betydelsefull art. Arbete pågår för att utveckla en diskriminerande PCR-test för *B. alvinipulli*. Sammanfattningsvis kunde vi visa att *Brachyspira*-bakterier av flera olika arter och/eller kloner samtidigt kan förekomma inom en flock och hos enskilda individer. Förutom att orsaka praktiska diagnostiska problem så är fenomenet vetenskapligt intressant och har tidigare inte beskrivits. PCR-analys visade att svindyseneribakterier (*B. hyodysenteriae*) inte förekom bland värphönsisolaten. *B. pilosicoli* påvisades inte i delstudie I, men har påvisats i flera av flockarna i delstudie II och från hobbyhöns i Sverige. Denna art är vanlig hos värphöns i andra länder, till exempel Australien. Orsaken till att arten är mindre vanlig bland svenska värphöns är oklar. Två olika PCR-system användes för att påvisa *B. intermedia*. Det ena systemet gav inga positiva reaktioner, medan det andra visade enstaka positiva isolat. Diagnostik enbart baserad på PCR är således otillräcklig för diagnostik av *Brachyspira*-bakterier från tamhöns.

Hägnade viltfåglar

Material och metoder: Ett urval av tidigare insamlade och nyinsamlade isolat undersöktes med PCR, PFGE och 16S rRNA sekvensering.

Resultat: Vi har kunnat visa att alla de tre *Brachyspira*-arter som kan orsaka produktionsstörning och diarré hos värphöns, förekommer hos hägnad viltfågel. *B. alvinipulli* har påvisats hos gräsand, *B. pilosicoli* hos gräsand, raphhöns och fasan, och *B. intermedia* hos gräsand och fasan. Vi påvisade även inledningsvis ett isolat av svindysenteribakterier (*B. hyodysenteriae*) i en besättning med gräsänder. Svindysenteribakterier hade fram till detta fynd bara isolerats från grisar, möss och farmade nanduer (*Rhea americana*) i Nordamerika. Vårt isolat från gräsand initierade en utökad undersökning av den besättning provet kom ifrån. Totalt 19 % av gräsänderna visade sig vara infekterade av svindysenteribakteriern eller genetiskt närbesläktade bakterier.

Vilda andfåglar

Material och metoder: Ett urval isolat från vilda andfåglar har karakteriserats med PCR, PFGE, RAPD och 16s rDNA-sekvensering.

Resultat: Följande arter påvisades hos vilda andfåglar: *B. alvinipulli*, *B. intermedia*, *B. pilosicoli* och *B. hyodysenteriae*, det vill säga samtliga potentiellt sjukdomsframkallande arter för tamhöns och/eller gris. Dessutom påvisades en med svindysenteribakterier närbesläktad ny genetisk variant. Bland isolaten från vilda gräsänder förekom svindysenteribakterier eller den närbesläktade genetiska varianten hos 8 % av fåglarna. Ytterligare ett par genetiska varianter har påvisats hos andfåglar. Dessa kan utgöra nya hittills ej beskrivna arter. Dessa kommer tillsammans med fortsatta studier av isolaten från vilda gräsänder att ingå i ett nytt doktorandprojekt på SVA/SLU.

Vilda kråkfåglar (råka, kråka och kaja)

Material och metoder: Eftersom flera arter av kråkfåglar (Genus *Corvus*) lever i nära kontakt med människor och husdjur, är allätare och ofta flocklevande tyckte vi att det var intressant att närmare undersöka förekomst och artsammansättning av *Brachyspira* spp. bland dessa fåglar. Kloakprover och/eller tarmprover samlades in med fångst- och djurförsöksetiskt tillstånd i samband med ringmärkning eller jakt. Proven samlades in i Skåne och Uppland i varierande livsmiljöer.

Resultat kråkfåglar: *Brachyspira*-bakterier påvisades hos alla tre fågelarterna. Andelen odlingspositiva fåglar var: kaja 60 %; kråka 28 % och råka 29 %. Prover tagna direkt från tarmen var i högre grad odlingspositiva, vilket antyder att förekomsten underskattades i kloakproverna. Tarmskador påvisades inte. 16S rDNA sekvensering visade att de flesta bakterierna tillhörde en hittills okänd *Brachyspira*-art. Bakterierna av denna art visade falskt positiv reaktion i PCR-systemet för *B. pilosicoli* vilket beror på de hade den så kallade signalsekvensen för *B. pilosicoli* som PCR-systemet är baserat på, vilket kan medföra diagnostiska problem. Ett isolat var av arten *B. pilosicoli*. Slutsatsen av undersökningen är att kråkfåglar sannolikt inte utför en betydelsefull smittrisk för tamhöns eller grisar.

Andra vilda fåglar: Enstaka isolat från andra vilda fåglar har undersökts, till exempel isolat från en slidnabb från Antarktis, och från vadare (brushane). I både fallen har vi påvisat varianter av *Brachyspira*-bakterier som inte är kända sedan tidigare.

7. Delstudie V: Patogenitetsstudier i en etablerad djurmodell.

Hösten 2003 genomfördes ett projekt på SLU/SVA med syfte att jämföra resultaten av bakterieisolering och PCR för diagnostik av svindysenteri (T. Råsbäck, resultat under publicering), och PCR infördes därefter i rutindiagnostiken. Detta ledde till att ”atypiska” svindysenteribakterier påvisades från tre svinbesättningar med svindysenteri. Bakterierna avvek från gängse mönster genom att vara negativa i den konfirmerande PCR-testen. Bakterierna från de tre besättningarna undersöktes genom 16S rDNA-sekvensering. Resultatet visade att sekvenserna hos bakterierna från de tre besättningarna var identiska med varandra och dessutom med tidigare här beskrivna isolat från vilda och hägnader gräsänder (Jansson *et al.*, 2004). Även gräsandsbakterierna var negativa i PCR-analysen. Fynden är mycket intressanta eftersom de väcker frågan om fåglars betydelse för smittspridning till husdjur. För att undersöka den sjukdomsframkallande förmågan hos de ”atypiska” svindysenteribakterierna genomfördes en experimentell infektion av grisar med en känt sjukdomsframkallande stam, ett ”atypiskt” isolat och ett närbesläktat gräsandsisolat. Försöket genomfördes dubbelblint. Grisarna utvecklade diarré. Vi återisolerade samma bakteriestammar som

grisarna hade infekterats med. Infektionsstudien vad vid tiden för vår ansökan inte planerad och denna del av försöket har därför finansierats genom akutbidrag från FORMAS.

Den infektionsmodell för fågel som vi avsåg att etablera, och för vilken vi sökte finansiering av SLF, har utformats och testats i praktiken. Modellen har utformats så att den ska vara användbar för flera fågelarter för att studera sjukdomsframkallande förmåga och till exempel smittvägar för *Brachyspira*-bakterier. Modellen testades för att studera svindysenteri- och närbesläktade bakterier hos djurslaget gräsand. Vi har kunnat visa att infektionen etablerades med svindysenterilikhande isolat från gräsand, med motsvarande isolat från gris, men inte med en referensstam av *B. hyodysenteriae*. Fåglarna infekteras både oralt och via kloaken. Smitta via kloaken har aldrig tidigare påvisats för *Brachyspira*-bakterier, och fyndet kan ha epidemiologisk betydelse. Vi kunde också visa att en grupp änder som inte infekterats, men som vistades tillsammans med infekterade änder, snabbt smittades. Ingen av fåglarna visade tecken på sjukdom till följd av infektionen. Detta stödjer vår hypotes att änder är en naturlig bärare av *Brachyspira*-bakterier och att de trots att de kan vara infekterade av för andra djurslag svårt sjukdomsframkallande arter, förblir friska.

8. Diskussion/slutsatser

Vi har i detta forskningsprojekt visat att infektion med *Brachyspira*-bakterier utgör ett ekonomiskt relevant problem i svenska värphönsbesättningar. Utredningar i enskilda flockar är ofta komplicerade på grund av otillräckliga och tidskrävande diagnostiska metoder och hög bakteriell diversitet på flock- och individnivå. De diagnostiska metoderna behöver förbättras, och artsammansättning och epidemiologi för *Brachyspira*-infektioner hos fåglar behöver studeras ytterligare. Projektet har visat att smittkällan sannolikt finns i omgivningen runt höns husen och att tama och vilda fåglar av vissa arter kan vara potentiella smittkällor för tamhöns- och grisbesättningar. Ekologiska höns och andra höns med tillgång till utevistelse förefaller extra utsatta för infektionen. Fynden av hittills okända *Brachyspira*-arter pekar på att kunskapen om denna typ av bakterier är otillräcklig.

9. Publikationer och publiceringsplan

Projektet om *Brachyspira* hos fåglar har resulterat i nedanstående publikationer. Det förväntas resultera i ytterligare minst fem vetenskapliga artiklar under 2006-2008, en artikel i Svensk Veterinärtidning samt ytterligare en populärvetenskaplig artikel i branschtidningen FJÄDERFÄ.

Granskade artiklar i vetenskapliga tidskrifter

1. Jansson DS, Fossum O, Satora K, Gunnarsson A, Fellström C. Förekomst av spiroketala infektioner (*Brachyspira* spp.) hos tamhöns i Sverige. *Svensk Veterinärtidning* 53, 69-74, 2001
2. Jansson DS, Bröjer C, Gavier-Widén D, Gunnarsson A, Fellström C. *Brachyspira* spp. (*Serpulina* spp.) in birds: review and a study of Swedish gamebirds. *Animal Health Research Reviews*, 2, 93-100, 2001
3. Jansson DS, Johansson K-E, Olofsson T, Råsbäck T, Vågsholm I, Pettersson B, Gunnarsson A & Fellström C. *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly β -haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Medical Microbiology* 53, 293-300, 2004

Kongress- och mötesrapporter

1. Jansson DS, Bröjer C, Gavier-Widén D, Gunnarsson, Fellström C. Cecal spirochetosis associated with *Brachyspira* species in Swedish gamebirds. 1st International Conference on Colonic Spirochetal Infections in Animals and Humans, Ekenäs Meeting, Sweden April 2-3, 2000
2. Jansson DS, Zimmerman U, Pettersson B, Gunnarsson A, Fellström C. *Brachyspira hyodysenteriae*, the etiologic agent of swine dysentery, isolated from mallards on a gamebird farm. XII International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Cairo, Egypt 28 January-1 February 2002
3. Jansson DS, Zimmerman U, Fossum O, Gunnarsson A, Fellström C. Triple infection with intestinal spirochetes (Genus *Brachyspira* spp.) in a Swedish layer flock with fecal staining of egg shells. XII

International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Cairo, Egypt 28 January-1 February 2002

4. Fellström C, Zimmerman U, Jansson DS, Gunnarsson A, Franklin A & Karlsson. M. *In vitro* susceptibility of avian isolates of *Brachyspira* spp. to six antimicrobial agents. XII International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Cairo, Egypt 28 January-1 February 2002
5. Jansson DS, Fossum O, Gunnarsson A & Fellström C. Infektion med tarmspiroketer – en orsak till smutsägg och sänkt äggproduktion. Jordbrukskonferensen 2002, SLU, Uppsala 19-20 november 2002
6. Jansson DS, Fossum O, Gunnarsson A & Fellström C. Tarmspiroketer – orsak till smutsägg och sänkt äggproduktion. Forum Forskning, 25 oktober, 2002 (arrangör SFS Svenska Ägg och SJV)
7. Jansson DS & Fellström C. Morphologic evidence of invasion of enterocytes by *Brachyspira* spp. in chickens with diarrhoea. Abstract 44. Proceedings The Second international Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. Barony Castle, Eddleston, Scotland, UK, 2-4 April, 2003
8. Jansson DS, Johansson K-E, Olofsson T, Pettersson B, Gunnarsson A, Zimmerman U & Fellström C. Analysis of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). Abstract 4. Proceedings The Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. Barony Castle, Eddleston, Scotland, UK, 2-4 April, 2003
9. Fellström C, Jansson DS, Råsbäck T, Pettersson B, Johansson K-E, Olofsson T, Thomson J, Gunnarsson A, Ahrné S. Emended description of strongly hemolytic intestinal spirochetes. Abstract 29. Proceedings The Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. Barony Castle, Eddleston, Scotland, UK, 2-4 April, 2003
10. Jansson D, Råsbäck T, Båverud V, Pringle M, Larsson L-G, Gunnarsson A, Johansson K-E, Fellström C. Atypiskt svindysenteriutbrott – möjlig spridning från vilda fåglar. Jordbrukskonferensen, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala SLF-rapport 68, 23-24 november, 2004
11. Jansson D, Råsbäck T, Johansson K-E, Fellström C. Svindysenteribakterier och andra starkt hemolyserande tarmspiroketer hos gris och gräsand. Nordiskt Möte, Wildlife Disease Association, Öland 19-22 maj 2005
12. Jansson DS, Johansson K-E, Zimmerman U, Gunnarsson A, Fellström C. Intestinal spirochetes isolated from Jackdaws, Hooded crows and Rooks (Genus *Corvus*). The Third International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. Parma, Italien, 5-7 Juni, 2005
13. Råsbäck T, Jansson DS, Johansson K-E, Fellström C. New strongly haemolytic porcine spirochaetes dissimilar to *Brachyspira hyodysenteriae*. The Third International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. Parma, Italien, 5-7 Juni, 2005

Populärvetenskaplig publikation

1. Jansson D. *Brachyspira*-bakterier hos värphöns och andra fåglar. FJÄDERFÄ 10, 54-57, 2005