

Betydelsen av biodiversitet inom det bakteriella släktet *Brachyspira* för patogenicitet och epidemiologi hos gris och fåglar

Bakgrund

Allmän bakgrund. Tarmbakterier, som tillhör släktet *Brachyspira* (trivialnamn: brachyspira), kan isoleras från flera olika arter av däggdjur och fåglar. Brachyspiror är, korkskruvsformade, rörliga och hemolytiska bakterier, som tillhör fylum *Spirochaetes* (trivialnamn: spiroketer). Detta fylum representerar en av ca. 25 huvudutvecklingslinjer, som bakterier delas in i. Brachyspiror är anaeroba, men syretoleranta eftersom de har ett enzym (NADH-oxidas), som kan neutralisera giftiga syremetaboliter (fria radikaler) och som sannolikt är en viktig överlevnadsmekanism. Genen som kodar för enzymet kallas *nox* och används för karakterisering av brachyspiror. En annan gen, som används för samma ändamål, är den s.k. *tlyA*-genen, som man tror har en regulatorisk funktion för hemolysinet. Hemolysiner är enzymer, som hjälper bakterien att bryta ner cellmembraner hos värdcellen, för att kunna utvinna näringsämnen. Genom att bestämma och jämföra nukleotidsekvenser för enskilda gener (eller hela genom = bakteriens arvsmassa) kan man dra slutsatser om organismers släktskap och om den genetiska variationen (biodiversiteten). Det är framför allt genen för 16S rRNA, som har kommit till användning vid studier av bakteriers släktskap (9). Genen för 16S rRNA kodar för ribosomalt RNA, vilket är det RNA, som bygger upp cellens ribosomer, d.v.s. den organell vid vilken cellens tillverkning av proteiner sker. Man kan även primärt identifiera brachyspiror genom att bestämma deras fenotyp (synliga egenskaper) som t.ex. om stammen i fråga ger svag eller stark hemolys vid odling i laboratoriet samt om den har eller saknar enzymerna tryptofanas, hippurikas, α -galaktosidas och β -glukosidas. Förkortningen s++++ betyder t.ex. att stammen har stark hemolys och bär på alla fyra ovan nämnda enzymer. Förkortningen w---- betyder svag hemolys och att enzymerna saknas. För närvarande finns sju officiellt erkända och flera föreslagna arter inom släktet *Brachyspira*. Föreslagna, men icke erkända arter brukar skrivas inom citationstecken, som t.ex. "*B. suanatina*". Flera arter kan orsaka diarrésjukdom, ökad dödlighet och/eller produktionsförluster inom gris- och fjäderfäproduktionen. Den mest kända arten är *B. hyodysenteriae*, som orsakar den mycket allvarliga diarrésjukdomen svindysenteri. *Brachyspira pilosicoli* orsakar spiroketal diarré hos gris och många forskare anser att den sjukdomen kan utgöra en zoonos, d.v.s. den kan spridas mellan djur och människa. *B. alvinipulli*, *B. intermedia*, *B. pilosicoli* och *B. hyodysenteriae* orsakar tarmsjukdomar hos fåglar. Andra arter, t ex *B. innocens* och *B. murdochii* anses inte vara sjukdomsframkallande. Tidigare forskning i Sverige och internationellt har främst fokuserat på brachyspiror hos grisar och kunskapen var mycket begränsad om förekomst hos andra djurslag, biodiversitet hos stammar från andra djur än gris, samt om spridningsvägar och möjliga reservoarer i naturen. Syftet med detta projekt var att vinna ökade kunskaper inom ovanstående områden.

Bakgrund till projektet Identifiering och subtypning av *Brachyspira*-arter. Nästan alla brachyspira-arter är närbesläktade. Detta medför svårigheter att avgöra vilken art en viss stam tillhör, vilket begränsar möjligheterna att göra bedömning av dess sjukdomsframkallande förmåga. Det går t.ex. inte att skilja på patogenen *B. hyodysenteriae* och *B. intermedia* (som ev. orsakar lindrig tarmsjukdom hos gris) genom 16S rRNA sekvensering. Ett värd djur kan bära på olika brachyspiror eller flera olika stammar av en art samtidigt. Därför är det viktigt att utveckla metoder för säker identifiering och då måste man fastställa vilka olika varianter det

finns på genotypisk och fenotypisk nivå hos gris och andra djur som kan vara smittbärare.

Bakgrund till projektet *Brachyspira* hos värphöns. Detta delprojekt har huvudsakligen finansierats genom stöd från ett annat SLF-projekt (projekt 137012). Ca. 500 *brachyspira*-isolat från svenska värphönsbesättningar har tidigare undersökts m.a.p. hemolys och biokemi. Ett antal av dessa stammar har nu renodlats och karakteriserats med biokemiska och molekylär-genetiska metoder för bedömning av sjukdomsframkallande förmåga.

Bakgrund till projektet *Brachyspira* hos kråkfåglar. Innan projektet startades fanns ingen vetenskaplig rapport om förekomst av tarmspiroketter från tättingar (ordning *Passeriformes*). Studien startades genom att *brachyspira*-liknande bakterier isolerades från en kaja vid en screeningsundersökning av ett stort antal individer av olika fågelarter vid Ottenby fågelstation. Praktiska svårigheter begränsar tillgången till prov av god kvalitet från vilda fåglar. Kråkfåglar (kaja, kråka och råka) utgör dock ett undantag genom att kommunerna bedriver jakt och vi har etablerat god kontakt med ornitologer, som kunde hjälpa till med systematisk provtagning.

Bakgrund till projektet *Brachyspira* hos vilda gräsänder. Studien bygger på tidigare insamlad material (bakterieisolat från träck), som kommer från två olika vilda gräsandspopulationer. Fåglarna provtogs konsekutivt på Ottenby Fågelstation, Öland hösten 2002 under höstflytten och vilda gräsänder provtogs i november 2000-maj 2001 i Pildammsparken i Malmö. Syftet med studien var att kartlägga biodiversitet och förekomst av fyra patogena *Brachyspira*-arter (*B. alvinipulli*, *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia* och *B. pilosicoli*) i representativa viltlevande gräsandspopulationer och att jämföra stammarna med isolat från andra djurslag. En bärande hypotes i delprojektet var att andfåglar kan utgöra en naturlig reservoar och att deras *brachyspiror* verkar vara genetiskt mer variabla än hos andra djurslag.

Bakgrund till projektet *Brachyspira* hos andra vilda fåglar. I samarbete med Uppsala Universitet och Kalmar Universitet insamlades prover från vilda sjöfåglar under två forsknings-expeditioner till Antarktis. Målsättningarna var att undersöka om *brachyspiror* förekommer hos vilda sjöfåglar i en geografiskt avlägsen region där det inte finns någon tidigare kartläggning och att jämföra med isolerade bakterier från tamdjur på andra kontinenter. Prover samlades in på Falklandsöarna (2009) och på Antarktiska halvön och subantarktiska öar 2002 och 2009. Falklandsöarna har en unik fågelfauna, som innefattar landlevande stannfåglar, fåglar knutna till sötvatten, sjöfåglar (knutna till havet), flyttfåglar som inte häckar på öarna och minst 140 arter som tillfälligt besöker öarna. Minst två arter är endemiska. Flera arter flyttar sommartid till Antarktiska halvön. I Antarktis finns ett 20-tal häckande fågelarter och på sommaren uppskattas att drygt 100 miljoner flyttfåglar häckar på Antarktis och närbelägna öar.

Bakgrund till projektet ”Nya” *Brachyspira*-arter med klinisk och/eller diagnostisk betydelse. Under de senaste åren har flera potentiellt nya *Brachyspira*-arter påvisats inom ramen för SVA:s rutindiagnostik eller forskningsprojekt vid SVA/SLU. Syftet med detta forskningsprojekt var att studera dessa potentiellt nya arter och slutmålet var att beskriva arterna vetenskapligt. Sammanfattningsvis representerar flera av dessa stammar potentiellt nya arter: ”*B. suanatina*” är en tarmpatogen, som förekommer hos gris och vilda gräsänder. De andra arterna finns hos vilda kråkfåglar (”*B. corvi*”) och gnagare (”*B. muridarum*”, ”*B. muris*” och ”*B. rattus*”) och deras sjukdomsframkallande förmåga är i dagsläget oklar. Alla arterna är av differentialdiagnostisk betydelse för veterinärmedicinska laboratorier.

Bakgrund till projektet Biodiversitet inom arten *Brachyspira alvinipulli*. *B. alvinipulli* är en sjukdomsframkallande art som beskrivits från en värphönsbesättning i USA. Genom experimentell infektion och en fallstudie från USA har denna art visats vara en orsak till diarré, smutsägg och sänkt äggproduktion hos värphöns, och därigenom ekonomiska förluster. Fram till helt nyligen har *B. alvinipulli* betraktats som en ovanlig bakterieart, som finns i nordamerikanska värphönsbesättningar. Endast ett fåtal isolat har beskrivits eller föreslagits i litteraturen (dock ej alltid med fullt vetenskapligt dokumenterad arttillhörighet) vilket sannolikt beror på att det idag helt saknas enkla diagnostiska metoder, t.ex. PCR, för att påvisa denna art. Under de senaste åren har dock ett par studier från Holland och Sverige indikerat att *B. alvinipulli* är mer vanligt förekommande hos höns än vad som tidigare var känt. Målet med denna delstudie var att karaktärisera isolat från fåglar, som har den för *B. alvinipulli* karaktäristiska fenotypen.

Material och metoder

Identifiering och subtypning av *Brachyspira*-arter. Vi har undersökt möjligheten att använda PFGE (pulsed field gel electrophoresis), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), sekvensering av *nox* och 16S rRNA-genen samt PCR-system, som har rapporterats vara specifika för olika *Brachyspira*-arter. I dessa system analyserades flera olika stammar, som representerade fem *brachyspira*-arter. Vi har också arbetat med att anpassa MLST (multi locus sequence typing) för identifiering av *brachyspira*-arter. I MLST-systemet analyserades 66 stammar representerande 6 godkända och 3 förelagna arter.

***Brachyspira* hos värphöns.** Isolat från värphöns representerande fyra olika inhysningssystem valdes ut för fenotypning och 16S rRNA-sekvensering. Om sekvenseringsresultaten antydde blandade kulturer gjordes renodling genom seriespädningar och 30 stammar valdes ut för vidare analyser. Dessa omfattade olika PCR-system (riktade mot 16S rRNA, 23 rRNA, *nox* och *tlyA*) och *nox*-gensekvensering. Undersökning avseende känslighet för antibiotika har utförts.

***Brachyspira* hos kråkfåglar.** Prov från kråkfåglar samlades in från fyra platser i samband med jakt eller ringmärkning: Hovgården (avfallsanläggning), Uppsala, inom stadsgränsen, Spillepengen, Malmö (område med öppna gräsbevuxna ytor, värmeverk, våtmarker, vattenverk mm.) och Pildammsparken, Malmö (stadspark). *Brachyspiror* isolerades med standardiserad metodik. Karaktärisering gjordes genom fenotypning, PCR för *B. pilosicoli* och gensekvensering av 16S rRNA och *nox*.

***Brachyspira* hos vilda gräsänder.** Spiroketisolaten (215 st.) från Ottenby testades fenotypiskt 2-4 ggr. och med PCR-system riktade mot *tlyA*-genen (artspecifik PCR för *B. hyodysenteriae*), *nox*-genen (artspecifik PCR för *B. intermedia*) och med två olika PCR-system mot 16S rRNA-genen (PCR som identifierar *B. pilosicoli* och "*B. corvi*", men kan ej skilja på dessa). Ursprungsisolaten från provtagningarna av gräsänder i Ottenby och Pildammarna renodlades genom seriespädning. En ny metod utvecklades för renodling av isolat, som är kontaminerade med andra typer av bakterier. Denna bygger på filtrering och tar till vara *brachyspirornas* rörlighet. Kontamination av isolat är ett allvarligt praktiskt bekymmer, som hittills varit svårt att komma tillrätta med. Trettiofem stammar valdes ut baserat på fenotyp och morfologi för att få ett så varierat material som möjligt. Stammarna testades fenotypiskt upp till 5 gånger och de finns sparade. Sex olika PCR-tester (ovan nämnda system samt ett för 23S rRNA- och ett för *tlyA*-genen, som båda är *B. hyodysenteriae*-specifika), har utförts. Två gener (16S

rRNA- och *nox*-genen) har sekvenserats från samtliga isolat. Undersökning avseende känslighet för antibiotika har utförts.

Brachyspira hos andra vilda fåglar. Prover samlades i samband med två expeditioner till Antarktis i samarbete med professor Björn Olsen, Uppsala Universitet. År 2002 insamlades 20 kloaksvabbar från åsnepingviner (19 prov) och ett prov från en större slidnäbb vid en fågelkoloni (Hannah Point), som ligger på sydkusten av Livingston Island norr om Antarktiska halvön). År 2009 insamlades 28 prover från bl a kejsarpingvin, kelpgås, större slidnäbb, och adeliepingvin. Proverna sparades i kylskåpstemperatur i upp till knappt 4 veckor under transport till Sverige. Vid ankomsten till Uppsala odlades de på två selektiva agarplattor (*Brachyspira*-agar och *B. aalborgii*-agar) vid 37 respektive 42 °C i upp till 12 dygn. Därefter undersöktes bakterierna med fenotypiska metoder, PCR och sekvensering av 16S rRNA- och *nox*-generna.

”Nya” *Brachyspira*-arter med klinisk och/eller diagnostisk betydelse. Den gällande artdefinitionen för bakterier bygger på en kombination av fenotypiska, genetiska och fylogenetiska (naturligt släktskap) egenskaper. Detta innebär att potentiellt nya bakteriearter kräver omfattande karaktärisering med en rad olika metoder, och så många isolat som möjligt bör studeras. Bl.a. måste en art vara genetiskt tillräckligt olik tidigare kända arter för att betraktas som en egen art. Detta kan bestämmas genom s.k. DNA-DNA-hybridisering, som ger ett mått på hur lika två DNA-preparationer är på helgenomnivå. Man brukar säga att om DNA-DNA-hybridiseringsvärdet understiger 70 % (vilket motsvarar ungefär 95 % sekvenslikhet) representerar de båda DNA-preparationerna olika arter.

Biodiversitet inom arten *Brachyspira alvinipulli*. Totalt 25 isolat med fenotypen w-+-+ har valts ut från SVA/SLU:s stamförråd. Isolaten härstammar från följande domesticerade arter: tamhöns (isolat från svenska värphönsbesättningar), gris och hund, och från vilda fåglar (gräsand, småskrake, bläsand, knölsvan och ejder). Isolaten har renodlats genom seriespädning och har karaktäriserats med fenotypning, sekvensering av 16S rRNA-genen, PCR, PCR-RFLP (än så länge enbart in silico) och DNA-DNA hybridisering.

Resultat

Identifiering och subtypning av *Brachyspira*-arter. Dendrogrammen (”släktskapsträden”), som erhöles efter PFGE, RAPD, 16S rRNA-sekvensering och *nox*-sekvensering, var ofta motsägelsefulla. Det var bara *B. pilosicoli*, som bildade monofyletiska grupper (med gemensamt evolutionärt ursprung) i alla systemen. Av de fem arter, som undersöktes, bildade alla fem monofyletiska grupper enbart i dendrogrammen från *nox*-sekvenseringarna (1, 2). Vi kunde också konstatera att PCR-systemen inte var helt tillförlitliga och därför inte längre kan betraktas som specifika (6, 8, 10, 17). Detta problem är mest uttalat vid karaktärisering av stammar från andra djur än gris. MLST-systemet kunde användas för identifiering av huvuddelen av patogena stammar från gris (1, 3).

Brachyspira hos värphöns. Efter renodlingar kunde 30 isolat representerande olika fenotyper och 18 olika besättningar väljas ut för vidare karaktärisering. Följande arter kunde identifieras: *B. alvinipulli* och *B. intermedia*, som orsakar diarré, samt *B. innocens*, *B. murdochii* och ”*B. pulli*”, som inte anses vara sjukdomsframkallande. För fyra isolat, kunde arttillhörig-

het inte fastställas. Anmärkningsvärt var att *B. pilosicoli*, som är en vanlig sjukdomsframkallande art i andra länder och som eventuellt är en zoonos, inte hittades (5, 8, 10). Slutsatsen som drogs från materialet är att brachyspiror är en potentiellt viktigt orsak i Sverige till ekonomisk förluster i äggnäringen.

Brachyspira hos kråkfåglar. Tarmspiroketer isolerades från 43 av totalt 116 kråkfåglar och isolat finns från alla tre provtagna arter. De är alltså vanligt förekommande hos kråkfåglar. Samtliga fåglar var friska individer i normal kondition utan tecken på diarré, utom en avmagrad ungråka med koccidios (parasitsjukdom). Vid obduktion och mikroskopisk undersökning kunde förekomsten av tarmspiroketer inte kopplas till tarminflammation eller annan sjukdom. PCR på tarmspiroketer visade falskt positiva reaktioner med ett PCR-system, som tidigare ansågs vara specifikt för arten *B. pilosicoli*, vilken orsakar tarminflammation och diarré hos gris och tamhöns. Nyligen har vi visat att det andra PCR-systemet (baserat på andra primers), som används av många andra rutin- och forskningslaboratorier runt om i världen för att påvisa *B. pilosicoli* också ger falskt positiva reaktioner vid analys av isolaten från kråkfåglar. Sekvensering av 16S rRNA-genen och *nox*-genen visade att samtliga isolat från kråkfåglarna var genetiskt mycket lika varandra, men ej identiska. Vid jämförelse med kända arter inom släktet *Brachyspira* utgör isolaten från kråkfåglar den genetiskt mest avvikande gruppen, och de representerar en egen art som inte tidigare varit känd. Vi har preliminärt föreslagit dessa bakterier som en ny art under namnet "*B. corvi*". Våra resultat talar starkt för att isolaten ska klassificeras inom släktet *Brachyspira* (7, 10). Genom ljus- och elektronmikroskopiska undersökningar har spiroketer påvisats i tarmkanalen hos kråkfåglar (kaja), som är koloniserade av "*B. corvi*". Bakterierna är lokaliserade till både tunntarm och grovtarm. Brachyspiror förekommer hos andra djur, med ett fåtal undantag, endast i grovtarmen (kolon och blindtarm). Spiroketer hos kråkfåglarna återfinns fokalt (ställvis) i tunntarmen där de fäster vinkelrätt in i tarmslemhinnan på ytan av tarmvilli på ett karaktäristiskt sätt men med en okänd mekanism. Detta mikroskopiska mönster påminner om det som kan observeras hos gris, tamhöns och människor vid kolonisation med *B. pilosicoli* och hos människa även med *B. aalborgi* (12).

Brachyspira hos vilda gräsänder. Femton olika fenotypiska mönster påvisades, varav endast 6 är förenliga med godkända *Brachyspira*-arter. Ingen speciell fenotyp dominerade materialet, men nästan var femte isolat hade samma fenotyp som typstammen för *B. alvinipulli*. Bara ett fåtal isolat av *B. alvinipulli* från tamfåglar finns tidigare rapporterade. Endast 4 av 215 isolat var starkt positiva för *tlyA*-genen, vilket visar att *B. hyodysenteriae* förekommer relativt sällan bland vilda gräsänder. Cirka 1/4 av alla isolat var PCR-positiva för *B. intermedia*, d.v.s. *B. intermedia* tycks vara en vanlig art hos vilda gräsänder. Många svagt hemolyserande tryptofanas- (indol-)positiva isolat var negativa och nyligen publicerade data visar att *B. intermedia* sannolikt består av flera olika arter. Ungefär 45 % av isolaten var positiva i båda PCR-systemen för *B. pilosicoli* (och "*B. corvi*"), vilket konfirmerar tidigare fynd från Australien (20) att *B. pilosicoli* är vanlig hos andfåglar. Cirka 25 % av isolaten kunde ej identifieras med PCR. Bland de 215 spiroketisolaten hittades många nya fenotyper och detta talar för att många av isolaten innehåller fler än en art/genotyp och/eller att den fenotypiska biodiversiteten är större hos fågel-brachyspiror än hos brachyspiror från däggdjur.

Baserat på sekvenseringsresultat har vi hittat följande arter hos vilda gräsänder:

***B. pilosicoli*:** stammarna är fenotypiskt högst varierande och inkluderar förutom den klassiska fenotypen (w-+-) även starkt hemolyserande stammar, hippurikasnegativa stammar som är genetiskt mycket lika de isolat från grisar, vilka tidigare har beskrivits från Finland och isolat

som har en fenotyp överensstämmande med *B. alvinipulli*. Alla dessa isolat är positiva i båda PCR-testerna för *B. pilosicoli*. I det fylogenetiska trädet bildas flera närbesläktade undergrupper, vilket talar för en hög biodiversitet inom arten hos gräsänder. Vid *nox*-sekvensering bildas det dock flera separata kluster, men betydelsen av detta intressanta resultat är oklar och måste analyseras ytterligare. *Brachyspira pilosicoli* har tidigare påvisats hos änder, men denna studie är den första där ett antal isolat från vilda änder och deras biodiversitet beskrivs. Denna höggradiga inomartsvariation har tidigare aldrig beskrivits för *B. pilosicoli*. I förlängningen är studien intressant ur både epidemiologiskt och zoonotiskt perspektiv eftersom liknande *B. pilosicoli*-stammar har isolerats från människor (kolerapatienter) i Asien.

***B. alvinipulli*-liknande stammar:** *B. alvinipulli*-liknande stammar med fenotypisk variation, där en del isolat avviker från typstammens fenotyp, har påvisats. Dessutom har de sekvensskillnader i 16S rRNA-genen och vid fylogenetisk analys bildar de ett spretigt kluster utan tydlig inbördes indelning i undergrupper. Liknande resultat erhöles vid analys av *nox*-genen. I dagsläget är det oklart huruvida de tillhör en eller flera olika arter. Vissa av stammarna är dock genetiskt lika typstammen (C1^T). Eftersom denna art sannolikt är vanligare än vad vetenskapssamhället hittills känt till och eftersom den är sjukdomsframkallande är våra resultat synnerligen viktiga och det finns anledning att ytterligare studera arten i detalj.

”*B. pulli*”: är en icke-erkänd art som tidigare har påvisats endast hos tamhöns i bl.a. Australien och Sverige. Dess enteropatogena potential är i dagsläget oklar. Fyra av isolaten i studien verkar tillhöra denna art.

***B. intermedia*:** fyra isolat i studien representerar sannolikt *B. intermedia* eller närbesläktade arter. För närvarande utgör isolat av denna typ kanske de besvärligaste inom *Brachyspira*-diagnostiken och det finns tydliga indikationer på att de egentligen utgör flera olika arter. PCR-resultaten är svårtolkade och ett isolat är t.ex. positivt för *B. hyodysenteriae* med PCR.

”*B. corvi*”: ett av isolaten är långsamväxande och har ett avvikande makroskopiskt utseende. Sekvensering visar att detta isolat är nära besläktat med ”*B. corvi*” som vi nyligen beskrev från kråkfåglar (7). Resultaten av hela delprojektet finns publicerade (17).

***Brachyspira* hos andra vilda fåglar.** Från de totalt 48 proverna från Antarktisexpeditionerna isolerades 4 primärisolat av *Brachyspira* sp. Från expeditionen 2002 var provet från den större slidnäbben från Livingstone Island positivt och från expeditionen 2009 var prover från 3 kelpgäss från Falklandsöarna positiva. Den låga förekomsten kan avspegla artskillnader, geografiska skillnader och/eller vara en konsekvens av att proverna inte kunde tas om hand förrän efter flera veckors transport. Primärkulturerna renodlades genom seriespädning och totalt erhöles sju unika isolat. Två av dessa isolat var fenotypiskt och genetiskt lika arterna *B. alvinipulli* respektive ”*B. pulli*” som förekommer hos tamhöns i Nordamerika, Europa (Sverige) och Australien och hos flyttande gräsänder som provtagits i Sverige, jfr. ovan (11, 17). Övriga isolat tillhör sannolikt unika hittills okända arter. Ett par av dessa isolat är svagväxande spiroketer som är genetiskt närmast besläktade med ”*B. corvi*” och ett isolat är mycket likt ett tidigare isolat från en ejder från Stockholms skärgård. Resultaten från Antarktisstudien kommer att sammanställas för publicering under 2012 (18).

”Nya” *Brachyspira*-arter med klinisk och/eller diagnostisk betydelse. Våra resultat visar att ”*B. suanatina*” ger lägre DNA-DNA-hybridiseringsvärden än 65 % för samtliga officiellt godkända arter inom genus *Brachyspira* och det högsta värdet (64 %) erhöles med *B. hyodysenteriae* och *B. intermedia*, vilket överensstämmer väl med den 16S rRNA-baserade fylogenin. I ett annat närliggande projekt rörande brachyspiror hos vilda gnagare har vi hittat tre potentiellt nya arter (”*B. muridarum*”, ”*B. muris*” och ”*B. rattus*”) och dessa arter har karakte-

riserats biokemiskt och genom fylogenetiska analyser. Vi har ännu inte kunnat få de potentiellt nya arten godkända, men de finns föreslagna i avhandlingar (1, 10, 14) samt vetenskapliga artiklar (4, 7, 13, 15) och vidare arbete pågår med i första hand ”*B. suanatina*”.

Biodiversitet inom arten *Brachyspira alvinipulli*. Fenotypisk analys har genererat en del överraskande resultat. Det har visat sig att den fenotyp, som typstammen för *B. alvinipulli* (C1^T) har, inte är karaktäristisk för arten. En del av de utvalda isolaten har vid närmare studier visat sig representera *B. pilosicoli* (bl.a. isolatet från gris) och denna fenotypiska variant av *B. pilosicoli* har tidigare inte beskrivits. Som väntat är alla isolaten hittills negativa i alla PCR-tester (med undantag för dem som visats representera *B. pilosicoli*). Sekvensering av 16S rRNA- och *nox*-generna har visat att det finns en betydande genetisk variation mellan isolaten. De bildar dock ett sammanhållet kluster utan tydlig indelning i subkluster. DNA-DNA-hybridisering (se ovan) utfördes på ett isolat från en småskrake och typstammen C1^T. Analysen visar överraskande att de inte tillhör samma art. Sammantaget visar ovanstående resultat att biodiversiteten inom denna grupp av spiroketer är mycket högre än förväntat. Det går inte idag att säga vilka av isolaten som är *B. alvinipulli*. Tillhör alla samma art eller flera olika arter? Studierna har dock visat att *B. alvinipulli*-liknande isolat finns hos en rad andra fågelarter än tamhöns. Ett tidigare beskrivet hundisolatet tillhör också samma grupp bakterier. I nuläget går det inte att utveckla en diagnostisk PCR, eftersom arttillhörigheten hos isolaten är oklar. För att kunna göra det krävs ytterligare studier, inklusive DNA-DNA-hybridisering på flera av stammarna. Resultaten är ännu ej publicerade.

Ny gen för β -laktamresistens beskriven. Känslighet för olika antibiotika undersöktes bland 48 karaktäriserade brachyspira-isolat från värphöns och vilda gräsänder (16). Resultaten visade hög känslighet för de testade substanserna bland isolaten från värphöns, vilket står i kontrast mot andra länder där antibiotikaanvändningen till fjäderfän är högre än i Sverige. En ny variant av en klass D β -laktamasgen (*bla*_{oxa-192}) hittades dock hos ett isolat av *B. pilosicoli* från en vild gräsand. Denna gen medierar resistens mot β -laktamantibiotika, till vilka t.ex. penicilliner hör. Detta är första fyndet av en sådan gen från den vilda faunan, som antas ha låggradig exponering för antibiotika.

Diskussion

Stor biodiversitet och stor utbredning inom släktet *Brachyspira*: Viktiga och delvis oväntad slutsats av detta projekt är att bakterier inom släktet *Brachyspira* är genetiskt mycket mer variabla, geografiskt mer spridda och har fler naturliga värdjur än tidigare känt. Detta har direkt relevans för diagnostik, smittspridning och möjligheter till framgångsrik bekämpning bland tamdjur. Den stora variationen inom släktet och de ”flytande” gränserna mellan de olika brachyspira-arterna innebär att det tyvärr idag inte finns någon enskild diagnostisk metod för säker identifiering av alla brachyspiror, utan man måste använda en kombination av ofta kostsamma och arbetskrävande metoder, särskilt vid studier av isolat från andra arter än gris. MLST-system kan troligen förbättras avsevärt genom att utnyttja andra gener än de som utnyttjades i vårt system, som dock visade sig var användbart för patogena brachyspira-arter från gris. Sekvensering av 16S rRNA genen och fylogenetisk analys har visat sig vara en mycket användbar metod för preliminär artbestämning och bedömning om ett visst isolat är rent eller består av olika stammar. Med stor sannolikhet finns det en rad okända, ännu ej karaktäriserade *Brachyspira*-arter och varianter bland vilda fåglar som vi idag saknar kunskap om ifall

de har förmåga att kolonisera tamdjur och orsaka sjukdom. Detta projekt har även i hög grad bidragit till att kunskapen har ökat om förekomst och naturliga värddjur för de olika arterna, men det finns fortfarande stora kunskapsluckor. Insikten att *Brachyspira*-arter sannolikt är utbredda i naturen bland vilda djur och att de även finns på avlägsna platser innebär på sikt ökade möjligheter att förebygga infektionen hos tamdjur.

Komplex bakterieflora: Våra resultat visar att fåglar ofta bär på flera arter/varianter samtidigt, vilket kräver renodling och mycket noggrann diagnostik. Detta fenomen har ofta förbi-setts, men har nyligen uppmärksammats även bland grisar, vilket kan förklara en del märkliga resultat från litteraturen. Inom ramen för projektet har vi utarbetat effektiva metoder för att renodla brachyspiror liksom för att eliminera kontaminanter (bakterier av andra typer) som kan vara ett betydelsefullt diagnostiskt problem genom att värdefulla isolat går förlorade.

”*Brachyspira corvi*” – art som lätt kan förbises: Det finns inga belägg för att tarmspiroketer hos kråkfåglar är sjukdomsframkallande. Påvisande av brachyspiror hos tättingar är inte bara ett fynd inom en ny fågelordning utan visar även att vi hittills har underskattat biodiversiteten inom släktet *Brachyspira*. Förekomst av ”*B. corvi*” utgör potentiellt ett viktigt differential-diagnostiskt problem för de laboratorier som förlitar sig på enbart PCR för att artbestämma brachyspiror. Det är viktigt att bestämma vilka djurslag, som kan vara bärare av ”*B. corvi*” för att man ska kunna bedöma riskerna för en falskt positivt reaktion, om man använder 16S rRNA-baserade PCR-system för *B. pilosicoli*. Förekomsten av ”*B. corvi*” hos andra fågelarter (och däggdjur) är i dagsläget oklar. Nyligen har vi dock påvisat ett mycket närbesläktat isolat från en flyttande gräsand (17) och liknande bakterier kan förekomma hos andfåglar i Sydamerika. Förekomsten av ”*B. corvi*” kan vara underskattad eftersom arten växer långsamt *in vitro* och bildar små kolonier och otydlig svärmning, som lätt kan förväxlas med andra bakterier.

Är andfåglar naturliga värddjur för brachyspiror? Baserat på våra resultat finns nu starkt stöd för att betrakta andfåglar som naturliga värddjur för brachyspiror, inkluderande samtliga idag kända sjukdomsframkallande arter hos tamdjur: *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, ”*B. suanatina*” och *B. alvinipulli*. Vårt projekt är den första studien, som visar på den enorma komplexitet och biodiversitet som brachyspirafloran i tarmen hos en vilt levande fågelreservoar kan utgöra. Studien visar också på en genetisk likhet mellan dessa isolat från vilda fåglar och isolat som härstammar från tamdjur. Det finns även anledning att spekulera om änder utgör en källa för nya varianter av brachyspiror som potentiellt kan spridas till tamdjur och möjligen till människor. Det faktum att änder ofta är koloniserade av flera olika arter och/eller genetiska varianter samtidigt i samma del av tarmen kan utgöra en grund för genetiskt utbyte mellan bakterierna. Brachyspiror kodar i sin kromosom för en s.k. profag som kan slumpmässigt överföra segment av arvsmassan till andra brachyspiror och därigenom ge upphov till nya varianter. Detta är ett mycket angeläget framtida forskningsområde.

”Nya” *Brachyspira*-arter med klinisk och/eller diagnostisk betydelse: Som ett resultat av projektet har fem potentiellt nya brachyspiraarter (”*B. corvi*”, ”*B. muridarum*”, ”*B. muris*”, ”*B. rattus*” och ”*B. suanatina*”) beskrivits. Studierna har hittills konfirmerat att ”*B. suanatina*” utgör en ny sjukdomsframkallande art hos gris inom släktet *Brachyspira*. Arbete återstår dock med alla arter innan de föreslagna namnen kan godkännas av den taxonomiska kommittén.

Sammanfattning. Internationellt sett är brachyspira-infektioner ett stort och växande problem bland tamdjur, som kompliceras av att antalet verksamma antibiotika minskat på senare tid. I

detta forskningsprojekt har en stor mängd nya data genererats som kan utgöra en bas för fortsatta studier av brachyspiror. Vi har fokuserat på de bristfälliga diagnostiska metoderna och på biodiversiteten inom detta bakteriesläkte. Kunskapen om att det finns en naturlig reservoar i naturen, som kan transportera bakterierna över stora områden, ger nya aspekter på epidemiologin och möjligheterna att eliminera smittan från enskilda besättningar, regioner och länder. Fynden av fem hittills okända *Brachyspira*-arter visar att vår kunskap är otillräcklig.

Övrig information

VMD Désirée S. Jansson (SVA) har tidvis varit inställd inom ramen för projektet (med finansiering av lön från bl.a. Formas) och hon har hela tiden ingått i projektgruppen.

Publikationer (som tillkommit tack vare projektet)

1. **Råsbäck T.** 2007. Laboratory diagnostics in *Brachyspira* species. Doktorsavhandling (2007:69). Sveriges Lantbruksuniversitet.
2. **Fellström C, Råsbäck T, Johansson K-E, Olofsson T and Aspán A.** 2008. Identification and genetic fingerprinting of *Brachyspira* species. J. Microbiol. Methods **72**:133-140. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096259>
3. **Råsbäck T, Johansson K-E, Jansson DS, Fellström C, Alikhani MY, La T, Dunn DS and Hampson DJ.** 2007. Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes within the genus *Brachyspira*. Microbiology **153**:4074-4087. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048921>
4. **Råsbäck T, Jansson DS, Johansson K-E and Fellström C.** 2007. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated "*Brachyspira suanatina*" sp. nov. Environ. Microbiol. **9**:983-991. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17359270>
5. **Jansson, DS., C. Fellström, T. Råsbäck, A. Gunnarsson, and K.-E. Johansson.** 2007. Characterization of *Brachyspira* spp. from Swedish laying hens. Abstract no. 37. The Fourth International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, May 20-22, Prague, Czech Republic.
6. **Fellström C, Råsbäck T, Johansson K-E, Olofsson T and Aspán A.** 2008. Identification and genetic fingerprinting of *Brachyspira* species. J. Microbiol. Methods **72**:133-140. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096259>
7. **Jansson DS, Fellström C and Johansson K-E.** 2008. Intestinal spirochetes isolated from wild-living jackdaws, hooded crows and rooks (genus *Corvus*): provisionally designated "*Brachyspira corvi*" sp. nov. Anaerobe **14**:287-295. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952187>
8. **Jansson DS, Fellström C, Råsbäck T, Vågsholm I, Gunnarsson A, Ingermaa F and Johansson K-E.** 2008. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from laying hens in different housing systems. Vet. Microbiol. **130**:348-362. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18375077>
9. **Johansson K-E, Jansson DS, Pringle M, Råsbäck T, Tamm S och Fellström C.** 2008. Brachyspirors evolutionära historia – eller varför byter man namn på dem så ofta? Svensk Vet. Tidn. **60(11)**:11-18. <http://svf.se/sv/Tidningen/Innehallsforteckningar1/2008---nummer-11/>
10. **Jansson DS.** 2009. Genus *Brachyspira* in birds: phenotypes, phylogeny and pathogenicity. Doktorsavhandling (2009:14). Sveriges Lantbruksuniversitet.

- <http://pub.epsilon.slu.se/1943/>
11. **Jansson DS, Broman T, Waldenström J, Bonnedahl J, Olsen B, and Johansson K-E.** 2009. Intestinal spirochaete isolated from a snowy sheathbill (*Chionis alba*) in Antarctica. The Fifth International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, June 8-10, Leon, Spain.
 12. **Jansson DS, Fellström C, and Feinstein R.** 2009. Light microscopical and ultrastructural features of small and large intestinal spirochaetes from jackdaws (*Corvus monedula*). Abstract no. 30. The Fifth International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, June 8-10, Leon, Spain.
 13. **Råsbäck T, Johansson K-E, Jansson DS, Båverud, V och Fellström C.** 2009. Laboratoriediagnostik av *Brachyspira*-arter och en ny svindysenteribakterie. Svensk Vet. Tidn. **61(8-9)**:11-16.
<http://svf.se/sv/Tidningen/Innehallsfor-teckningar/2009---nummer-8-9/>
 14. **Backhans A.** 2011. Wild rodents as carriers of potential pathogens to pigs, chickens and humans. Doktorsavhandling (2011:44). Sveriges Lantbruksuniversitet.
<http://pub.epsilon.slu.se/8105/>
 15. **Backhans A, Johansson K-E and Fellström C.** 2011. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from wild rodents. Environ. Microbiol. Reports. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1758-2229.2010.00165.x/full>
 16. **Jansson DS and Pringle M.** 2011. Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira* spp. isolated from commercial laying hens and free-living wild mallards (*Anas platyrhynchos*). Avian Pathol. **40**:387-393.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21812718>
 17. **Jansson DS, Persson M, Zimmerman U, and Johansson K-E.** 2011. Phenotypic and genetic diversity among intestinal spirochaetes (genus *Brachyspira*) in free-living wild mallards (*Anas platyrhynchos*) sampled in southern Sweden. Systematic Applied Microbiol. **34**:566-575. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036527>
 18. **Jansson DS, Broman T, Waldenström J, Bonnedahl J, Olsen B and Johansson K-E.** 2012. Intestinal spirochaetes (genus *Brachyspira*) isolated from a snowy sheathbill (*Chionis alba*) in Antarctica and in Kelp geese (*Chloephaga hybrida*) on the Falkland Islands. In manuscript.