

SLUTRAPPORT

TITEL: KARAKTÄRISERING AV INFEKTIÖST BRONKIT VIRUSSTAMMAR OCH ANPASSNING AV DIAGNOSTIKMETODERNA

PROJEKT REFERENS: H1043244

DJURSLAG: Slaktfjäderfä

1. INTRODUKTION:

IB orsakas av infektiöst bronkitvirus (IBV), klassificerat som grupp 3 coronavirus i ordningen *Nidovirales* (Cavanagh, 2001 and 2007). Sjukdomsbilden kännetecknas av kraftiga luftvägssymtom med näs- och/eller ögonflöde, snuva och hosta, framförallt hos unga kycklingar. Tillväxtstörningar förekommer och orsakar stora förluster vid slakt, och hos värphöns ses en sänkt äggproduktion och försämrad äggkvalitet i form av tunnflytande äggvita och nedsatt skalkkvalitet. Yngre värphöns kan helt förlora förmågan att värpa och blir s.k. *blind layers*. Njurskador orsakade av vissa typer av IBV har också rapporterats, men har hittills inte påvisats i Sverige. Sjukligheten är hög men dödligheten varierar med ålder och immunstatus hos drabbade kycklingar. Dödligheten kan vara så hög som 25 % hos unga kycklingar och är ofta relaterad till sekundära bakteriella infektioner. Hos vaccinerade individer och flockar är infektionen i allmänhet mild eller subklinisk, men levande vaccinvirus kan i sig orsaka sjukdomssymtom särskilt om vaccinationen inte utförs på ett korrekt sätt.

IBV-genomet är ett positivt riktat enkelsträngat RNA, 27.6 Kb stort. Genomet kodar för två polyproteiner (s.k. replikasproteiner) som har olika funktioner under virusets livscykel och för fyra strukturella proteiner: *spike*- (S), hölje- (E), membran- (M) och nukleokapsidprotein (N) (Lai and Cavanagh, 1997). På grund av deras funktionella betydelse är replikas- och N-genen väl konserverade såväl mellan som inom de olika coronavirusstyperna. Detta gör dessa delar av genomet till lämpliga målområden för molekylär-diagnostiska tester (Escutenaire et al., 2007). S-genen och S-proteinet är de genetiskt respektive antigen mest variabla delarna av viruset, och har därför använts som målområden för tester med avsikt att skilja mellan olika typer av IBV (Cavanagh, 1995; Dolz et al., 2006; Ignjatovic et al, 2006; Lee et al., 2003). Den höga mutationsfrekvens som är typisk för RNA-virus i allmänhet (Domingo & Holland, 1997), samt S-genens benägenhet att rekombinera är en huvudsaklig förklaring till IBV:s variation (Jia et al., 1995; Dolz et al., 2006; Bochkov et al., 2007). Denna variation hos viruset ger ett behov av ständig anpassning av detektion och typningsmetoder för att hitta nyuppkomna varianter (Lee et al., 2000 and 2003; Callison et al., 2006).

I likhet med andra coronavirus förändras IBV ständigt och ger upphov till nya virusvarianter. Förekomst av olika genotyper och serotyper utgör ett problem för påvisande av virus och speciellt för typning av nya varianter. Insatser har därför riktats mot att utveckla molekylära metoder för bred detektion och för typning av IBV, som kan användas vid nya utbrott. Förekomst av olika virusvarianter utgör dessutom en risk för sämre eller uteblivet skydd vid vaccination, om inte vaccinet har förmåga att skydda mot flera virusstyper. Detta kan vara förklaringen till att några nya IBV varianter orsakar sjukdom trots att flocken är vaccinerad och har antikroppar. Å andra sidan kan vaccination, om inte rätt utförd enligt gällande bestämmelser, också leda till att nya virusvarianter uppstår.

Läget i Sverige och övriga Nordiska länder

Ett utbrott av IB i de södra delarna av **Sverige** på 1990-talet ledde till att vaccination av värphöns- och avelsbesättningar introducerades 1997. Vaccinet som användes var "Massachusetts type vaccine" (MA5), vilket hade god effekt mot den cirkulerande virusvarianten, och under många år förekom inga nya utbrott. Under 2006 rapporterades återigen problem hos värphöns. Undersökning av dessa nya utbrott visade att de orsakats av en IBV variant som tidigare påvisats i samband med IB i Nederländerna. Senare har det förekommit fall hos slaktkycklingar, med dålig tillväxt som huvudsymtom, vilka också visade sig vara associerade med den nya varianten av IBV, den så kallade QX-like eller D388 typen. Denna virustyp har på senare tid varit involverad i många utbrott av IB i Europa och Asien.

Vaccinationsrekommendationen anpassades till att innefatta vaccin även mot denna virus-typ. Hos slaktkycklingarna har symptomen inte varit respiratoriska, utan snarare varierande grad av tillväxtstörning och ibland sekundära bakteriella infektioner. Det kan göra det svårt att känna igen sjukdomen under normala förhållanden. I dagsläget sker vaccination mot IB av samtliga avelshöns och unghöns, en okänd och sannolikt minskande andel värphöns, samt ett fåtal slaktkycklingsbesättningar i sydöstra Sverige.. Immuniteten är kortvarig och följaktligen krävs regelbunden vaccination ungefär var 8:e vecka för att uppnå god immunitet. Levande vaccinvirus av typen Massachusetts och 4/91 används för närvarande. Information om rekommenderat vaccinationsprogram finns att läsa på SVA:s hemsida [<http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Fjaderfa/Vaccination>]. För slaktkyckling finns inte någon generell rekommendation.

På **Island** har IBV inte påvisats sedan år 2000. Däremot har det funnits obekräftade misstankar om att sjukdomen funnits på en gård med värphönsbesättning under de senaste två åren. En utredning startades då flocken aldrig nådde den förväntade äggproduktionen och under utredningen uppdagades det att det även hos en tidigare flock på samma gård funnits symptom, som ägg med dåliga skal, som kan ha orsakats av IBV. Diagnosen har inte kunnat fastställas då både serum och organproverna (cecal tonsils) har varit negativa. Då det inte går att utesluta IB är det av stor vikt att följa upp den aktuella flocken och att även vara observant om liknande symptom visar sig i andra besättningar. Ingen vaccinering mot IB förekommer på Island. Därför är det av stor betydelse att använda sig av känsligare metodik för att kunna identifiera bakomliggande orsaker till dessa fall.

I **Danmark** har IB påvisats i båda slakt- och värphönsbesättningar med hjälp av molekylär-diagnostiska metoder som Realtids-PCR. En sammanställning av resultatet från 2011 visar att IBV kunde påvisas i 92 av 120 insamlade prover. Bland de påvisade virusvarianterna var 18 fall av Massachusetts typ (20%), 13 av 4/91 typ (14%), 46 av så kallade QX typ (50%) och 15 fall (16%) som inte kunde typas. Undersökningen visar att som i övriga Europa, inklusive Sverige, är den mest dominerande IBV typen i Danmark den så kallade QX typen. Närheten till kontinenten och ökad handel kan vara en del av förklaringen till det stora antalet IB fall i Danmark. Sedan mitten av Januari vaccineras kycklingarna med den klassiska s.k. Massachusettstypen, MA redan i kläckeriet. I delar av landet vaccineras även slaktkycklingarna med 4/91 typen vid två veckors ålder. Unghönsen vaccineras som daggamla och vid 7-8 veckors ålder med levande Ma typ och med 4/91 typ vid 2 och 12-13 veckors ålder. Innan flytt till produktionshuset, vid 16-17 veckors ålder, vaccineras värphönsen med

inaktiverat IB-vaccin kombinerat av M41 och 249G (D274/D207) typ. Under produktionen vaccineras en del av flockarna var åttonde till tionde vecka med en MA- eller 4/91 typ vaccin.

I **Finland** liknar den tidigare historien om IB läget i Sverige fram till 1994. Ingen IB förekom i landet och situationen kunde hållas under kontroll mycket tack vare de strikta importföreskrifter som kunde upprätthållas på grund av den goda Salmonella situationen, samt det faktum att ingen vaccination mot NDV fick förekomma. Under våren 2011 påvisades IB på en värphönsbesättning med kliniska symptom i södra Finland, detta för första gången sedan 1970-talet. Fallet uppdagades då gården kontaktade Finländska veterinärmyndigheten efter att man konstaterat sådana symptom hos hönorna som är typiska för IB, såsom sänkt äggproduktion, förändrad kvalitet på äggen och luftvägssymptom. I samband med utredningen kunde man dock konstatera att ett antal hobbyflockar hade antikroppar mot IB. Vidare epidemiologisk sammanställning av laboratorieresultat tillsammans med förekomst av kliniska fall i form av respiratoriska symptom och nedgång i produktion tyder på att smittan har funnits i hönspopulationen under en längre period och förekommer hos både värphönsoch slaktkycklingsbesättningar. Diagnostiken är baserad på PCR, virusodling och serologisk screening med hjälp av kommersiellt ELISA Kit. Finland har en unik situation då man nu överväger att introducera vaccin mot IB. Därför är det ytterst viktigt att först identifiera de cirkulerande virusstammarna i fjäderfäpopulationen.

I **Norge** har IB aldrig påvisats och det förekommer ingen vaccinering. Fjäderfä som importeras testas för antikroppar mot IBV. Under 2011 blev det påvisat antikroppar mot IBV i en fjäderfäbesättning utan att virus kunde detekteras. Om IBV skulle påvisas i Norge slaktas besättningen ut. Norge har en unik situation bland de Nordiska länderna genom att IB inte förekommer och att fjäderfä inte vaccineras.

2. SYFTE:

Syftet med projektet var:

1. Att karaktärisera förekommande stammar eller varianter av IBV, som kan utgöra en bas för utveckling av nya farligare varianter och för att kunna följa utvecklingen av nya stammar. Detta är viktigt epidemiologiskt och för anpassning av diagnostikmetoder.
2. Att anpassa molekylära diagnostik- och typningsmetoder för IBV till stammar som cirkulerar i Sverige och de andra nordiska länderna, baserat på sekvensdata som produceras från analys av olika IBV-stammar från Sverige och andra länder i Norden.

3. METODER OCH RESULTAT:

Provmaterial och PCR-amplifiering

Under perioden 2011-2014 (t.o.m. oktober månad) har totalt 33 prover från slakterier och fjäderfäbesättningar, med misstanke om IB, skickats till SVA för analys. Virusnukleinsyra extraherades från organmaterial (cecal tonsils) i en extraktionsrobot med en metod baserad på magnetseparation och analyserades därefter med en realtids-PCR för att detektera nukleinsyra från IBV. Av dessa 33 prover var 20 prover IBV-positiva. Prover från Danmark och Finland skulle också ha analyserats, men detta fullföljdes inte då projektteamet splittrades innan projektet avslutades.

Virusisolering

Virusisolering från de prover som var positiva i realtids-PCR gjordes på embryonerade hönsägg. Dessa isolat har sparats i en virusbank för djupare karaktärisering av viktiga egenskaper hos de nya virusstammar som cirkulerar i fjäderfäpopulationen.

Sekvensanalys och studier om variabilitet av IBV stammar

Liksom andra RNA-virus kännetecknas IBV av sekvensvariabilitet och förmåga till anpassning till nya miljöer. Eftersom detta till stor del bestäms av sekvensvariationer i S-genen (Spike-genen), så är studier av denna del av genomet nödvändiga för att fastställa samband och skillnader mellan olika virusstammar. Virusisolaten användes för att amplifiera och sekvensera hela S-genen för att fastställa den genetiska variationen. Resultat från sekvensanalysen bekräftade en hög variation i S1-regionen medan S2-regionen var "konserverad". Variationen i S1-regionen kan potentiellt förändra virusets egenskaper, inkluderande de epitoper som känns igen av antikroppar. Detta kan resultera i att viruset inte längre känns igen av antikroppar.

Molekylärepidemiologiska analyser utfördes baserade på dels den variabla delen av S1-regionen och dels den fullständiga sekvensen för hela S-genen. Sekvensdata från svenska IBV-isolat från 1995 till 2013 och sekvenser från GenBank avslöjade fyra distinkta kluster; genotyperna Massachusetts, QX-like, Italy-02 och 4/91. Svenska isolat från 1995 till 1999 samlades i samma kluster som Massachusetts. De svenska isolaten från 2006 och framåt bildade ett kluster tillsammans med sekvenser från Frankrike och Nederländerna tillhörande genotypen QX-like. Dessa skiljde sig till 18,7-21% från Massachusetts. Analysen avslöjade också nya grenar inom genotypen QX-like, vilket indikerar att nya stammar har uppstått, nära släkt med den QX-genotyp som finns i andra europeiska länder.

Utveckling och utvärdering av ett multiplext variationstolerant system för typning av olika IBV stammar

En vanlig detektions-PCR kan sluta fungera eftersom RNA virus introducerar nya mutationer i sitt genom vid replikering. Projektet använde en ny metod VOCMA - Variation tolerant Capture Multiplex Amplification, (patenterad av C. Öhrmalm, M. Jobs, R. Eriksson, och Prof. J. Blomberg), för att utveckla en IBV genotypnings-VOCMA, vilken ska kunna detektera samt särskilja de vanligaste förekommande genotyperna: QX(D388), M41, D274, Italy-02 or 4/91 (S1 genen).

En multiplex analysmetod som baseras på variationstolerans utvecklades för samtidig detektion och typning av IBV genotyper. Metoden består av ett första amplifieringssteg i en multiplex en-steps RT-PCR. Därefter följer hybridisering av biotinylerade PCR-produkter till IBV-specifika och genotyp-specifika prober som sedan analyseras i ett Luminexinstrument. Metoden uppvisade hög specificitet och kunde skilja mellan olika IBV-stammar tillhörande M41, Italy-02, 4/91, QX-like och D274. Metoden visade sig vara mycket specifik för samtidig detektion och typning och därför en potentiellt lämplig metod för övervakning av IB infektioner och för storskaliga epidemiologiska studier.

Innan metoden för typning införs i rutindiagnostiken måste den utvärderas avseende känslighet och specificitet mot både det realtidssystem som idag används för detektion och den konventionella PCR i S-genen som sedan sekvenseras. Dessutom behöver metoden utvärderas för olika typer av klinisk material. Slutprodukten blir ett integrerat system för snabb och säker detektion och typning av virus i samma reaktion.

4. INFORMATIONSSPRIDNING

Resultat från projektet har presenterats på följande sätt:

- a) På ett möte med fjäderfäindustrin organiserat av SVA.
- b) På den Nordiska fjäderfäkonferensen i December 2012
- c) I tidskriften Fjäderfä, Maj 2012
- d) I vetenskapliga publikationer:

Abro SH, Ullman K, Belák S, Baule C. (2012). Bioinformatics and evolutionary insight on the spike glycoprotein gene of QX-like and Massachusetts strains of infectious bronchitis virus. *Virology* 9:211.

Abro SH, Renström LH, Ullman K, Belák S, Baule C. (2012). Characterization and analysis of the full-length genome of a strain of the European QX-like genotype of infectious bronchitis virus. *Arch Virol*. 157:1211-1215.

Abro S, Renström L, Ullman K, Isaksson M, Zohari S, Jansson D, Belák S, Baule C. (2012). Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden. *Vet Microbiol*. 155:237-246.

Öhrmalm C, Abro S, Baule C, Zohari S, Bálint A, Renström L, Blomberg J, Belák S. Variation-tolerant capture multiplex assay (VOCMA) for simultaneous detection of avian infectious bronchitis virus genotypes by using multiplex RT-PCR and Luminex technology. Manus

5. SLUTSATS

Data om nukleotidsekvenser från de virusstammar som cirkulerar i den svenska fjäderfäpopulationen har genererats och kan användas för att kartlägga smittkällor vid nya utbrott orsakade av IBV, samt för att studera viruspoolen som orsakar utbrotten. Denna sekvensinformation är, tillsammans med den virusbank som skapats i projektet, mycket värdefull för fortsatta studier av IBV i Sverige.

Projektet har utvecklat verktyg för virusdetektion och virusstypning. En konventionell PCR i kombination med sekvensering används för molekylär epidemiologi. En analysmetod baserad på VOCMA har utvecklats för samtidig detektion och typning av fem olika genotyper av IBV. Dessa verktyg möjliggör en snabbare diagnostik och identifiering av de olika IBV-genotyper som kan vara involverade i ett utbrott.

Sammanfattningsvis bör övervakning av IB hos både slaktkycklingar och värphöns ske regelbundet så att kontrollstrategier kan anpassas efter den rådande situationen. Det vore värdefullt med en gemensam satsning, i de nordiska länder som är drabbade av sjukdomen, med syfte att identifiera och implementera lämpliga kontrollåtgärder anpassade till fjäderfäindustrin i regionen.

6. REFERENSER

Bochkov YA, Tosi G, Massi P, Drygin VV. (2007). Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Virus Genes* 35:65-71.

Callison SA, Hilt DA, Boyton TO, Sample BF, Robinson R, Swayne DE, Jackwood MV. (2006). Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J Virol Meth*. 138:60-65.

Cavanagh D. (1995). The coronavirus surface glycoprotein. In SG Siddell (Ed). *The Coronaviridae*, pp 73-114. New York, Plenum Press.

Cavanagh D. (2001). A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. *Avian*

Pathol. 30:109-115.

Cavanagh D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res.* 38:281-297.

Dolz R, Pujols J, Ordóñez G, Porta R, Majó N. (2006). Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. *Avian Pathol.* 35:77-85.

Domingo E, Holland JJ. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol.* 51:151-178.

Escutenaire S, Mohamed N, Isaksson M, Thorén P, Klingeborn B, Belák S, Berg M, Blomberg J. (2007). Development and evaluation of a SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method for the generic detection of coronaviruses. *Arch Virol.* 152:41-58.

Ignjatovic J, Gould G, Sapats S. (2006). Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Arch Virol.* 151:1567-85.

Jia W, Karaca K, Parrish CR, Naqi SA. (1995). A novel variant of avian bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Arch Virol.* 140:259-271.

Lai MM, Cavanagh D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 48:1-100.

Lee CW, Hilt DA, Jackwood MW. (2000). Redesign of primer and application of the reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism test to the DE072 strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 44:650-654.

Lee CW, Hilt DA, Jackwood MW. (2003). Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. *J Vet Diagn Invest.* 15:344-348.