

Slut rapport

Slutrapporten sammanfattar SLF projekten H1143121 enligt medgivande av SLF 2011-11-29 i Bidragskontrakt H1143121 Kst. 430.

Betydelse av aviära adenovirus för förekomst av Inklusionkroppss hepatit hos Svenska slaktkycklings besättningar

Vissa stammar av aviärt adenovirus (FAdV) kan ge upphov till skador i lever, blödningar i skelettmuskulaturen samt körtel och muskel mage som i förlängningen resultera dålig tillväxt och en ökad dödlighet hos fjäderfä främst slaktkycklingar. Förutom den försämrade djurhälsan och välfärden leder detta till stora ekonomiska förluster för den enskilde uppfödaren. Sjukdomen i Sverige har varit begränsad till slaktkyckling med ovanligt många sjukdomsfall under perioden 2010-2011. Den genomförda studien syftade till att isolera och genetiskt karakterisera de cirkulerande adenovirus stammarna och på så sätt öka kunskapen om adenovirus i landet samt att förbättra det diagnostiska verktyget för fastställande av diagnosen. Organmaterial från tio slaktkycklings besättningar där misstanke om inklusionkroppshepatit (IBH) förelåg, ingick i studien. Materialet samlades in under perioden november 2011 till februari 2013. Insamlade organmaterial användes för molekylär detektion samt isolering av FAdV. Närvaro av FAdVs arvsmassa påvisades med hjälp av PCR i nio av tio IBH misstänkta fall, däremot kunde virus isoleras enbart från sju av tio IBH misstänkta slaktkycklingsbesättningar. Vidare sekvensering av PCR-positiva prover visade att två FAdV arter (D, serotyp 2 och E, serotyp 8a) kunde påvisas hos de undersökta slaktkycklings besättningarna.

Bakgrund

Inklusionkroppshepatit (IBH) orsakar ekonomiska förluster för fjäderfäindustrin runt om i världen. Sjukdomen har i Sverige varit begränsad, då det är främst slaktkycklingar som har drabbats. Sjukdomsfallen har dock under senare år varit ovanligt många. Uppföljande undersökningar pekar på att sjukdomsutbrotten ofta inträffar i avkomma från vissa föräldradjur.

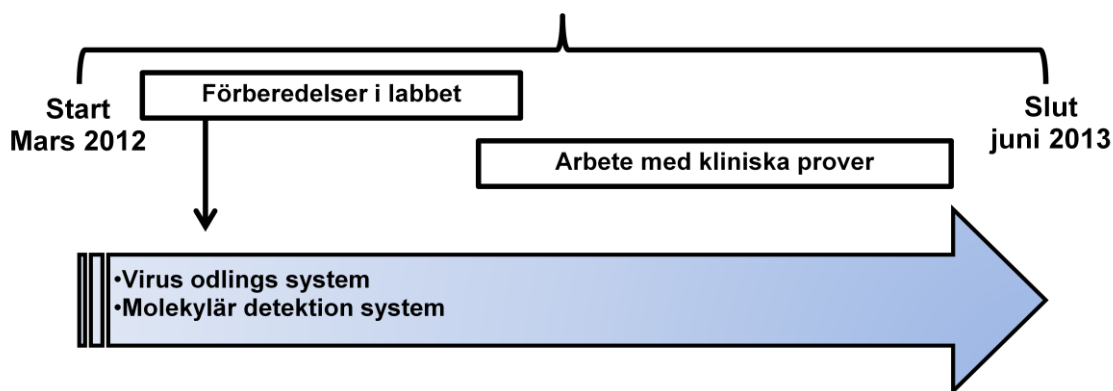
Vid ett utbrott ses en plötsligt förhöjd dödlighet som varar i en till två veckor med ett mycket akut sjukdomsförlopp. Dödligheten är i regel relativt låg (från några procent och ibland upp till tio procent) men dödlighet upp till 30 procent har rapporterats. Sjukligheten i en flock är i regel låg. Då sjukdomen drabbar slaktkycklingsflockar sent i livet kan den ibland upptäckas först i samband med slakt, vilket ökar förluster i form av kassationer. Inklusionkroppshepatit förorsakas av aviär adenovirus grupp I, ett DNA virus utan hölje som är mycket resistent mot yttre påverkan. Denna grupp innehåller tolv kända serotyper hos kyckling och flera serotyper hos anka och gås. De flesta av dessa serotyper kan finnas hos friska fåglar och deras betydelse för sjukdoms utbrott är många gånger osäkra. Hittills har diagnosen i samband med misstankar om IBH utbrott baseras enbart på mikroskopisk undersökning. Diagnosen kan fastställas genom mikroskopisk undersökning av sjukliga förändringar i lever samt förekomst av inklusionskroppar i levercellernas cellkärna. Serotypen på de virus- stammar som har förorsakat de senaste utbrotten är dock okänd. Därför finns det behov av att designa om dagens diagnostik för att uppnå bredare förståelse för vilken betydelse de olika virus serotyperna spelar i samband med IBH-utbrott.

Tidsplan

Med början under våren 2012 och i ett år framåt pågick ett projekt på SVA med syfte att närmare karakterisera sjukdomsframkallande aviära adenovirus hos Svenska slaktkycklingsbesättningar. Projektet var delfinansierat av Stiftelse Lantbruksforskning (SLF) och avsåg att ge svar på följande frågeställningar:

- Vilka genotyper av adenovirus ligger bakom sjukdomen inklusionskropps-hepatit hos svenska slaktkycklingar?
- Kan dagens diagnostik förbättras för att effektivisera fastställande av diagnos i samband med sjukdomsutredning?

Under första delen av projektet arbetade vi med att sätta upp virologiska och molekylära detektionsmetoder för påvisande av aviärt adenovirus. Vi utvärderade olika detektionssystem genom en serie av uppsatta experiment med hjälp av referens stammar och tidigare inskickade material. Arbetet med kliniska fall påbörjades därefter och avslutades i juni 2013. Resultatet analyserades vidare fram till augusti 2013.



Diagnostik

Diagnosen kan idag endast ställas genom mikroskopisk/histologisk undersökning. Förändringarna vid IBH är relativt karaktäristiska. Levern hos drabbade djur är ofta blek och svullen och man ser ofta leverblödningar (bild 1).

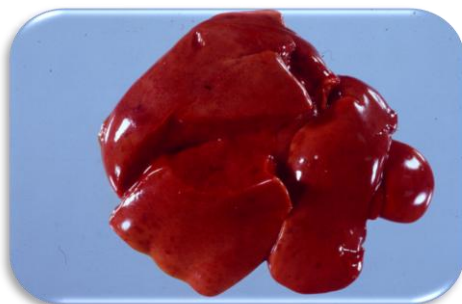


Bild 1. Lever med blödningar från kyckling med inklusionskroppshepatit (IBH). Foto: Désirée Jansson/SVA

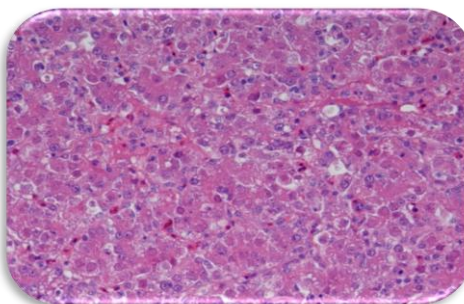


Bild2. Histologisk bild av lever från kyckling med IBH. Intranukleära inklusioner ses som mörka (basofila) kroppas i leverceller. Foto: Désirée Jansson/SVA

Blödningar kan också förekomma i skelettmuskulaturen. Mikroskopiskt ser man en generaliserad leverinflammation (hepatit). I ett varierande antal leverceller kan man se inklusionskroppar i cellkärnorna (bild 2).

Det kan dock finnas tillfällen där diagnosen inte kan fastställas enbart med hjälp av obduktion. Diagnosen kan kompletteras med molekylär undersökning (svar inom någon dag) eller med virusodling (tar längre tid).

Utvärdering av detektionsmetoder

Virusodling är fortfarande referensmetoden för påvisande av aviärt adenovirus och nödvändig för vidare karakterisering av cirkulerande virus stammar. Många virus kan propageras i olika cellinjer eller befruktade hönsägg, detta görs bland annat för att få en stor mängd enhetligt virus för vidare karakteriserings steg och användning i olika diagnostiska tester till ex. serum neutralisationstester. Olika cellinjer är mer eller mindre mottagliga för olika virus och i vissa fall kan viruset adopteras till en cellinje genom upprepande propagering och passage av det aktuella viruset.

Virusodling i cellkultur; För att kunna välja den mest effektiva odlingsmetoden för aviärt adenovirus utfördes en serie experiment där referens virus "European Chick Embryo Lethal Orphan" (CELO-FadV1) propagerades i flertal cell linjer/primära celler (Vero/MDCK-celler/ kycklingembryo-njur/lever celler).

Metodiken; Viruset (CELO-FadV-1) spädes till lämplig koncentration i cellodlingsmedium. För varje 162 cm² cellodlingsflaska överfördes c:a 2-5 mL virussuspension så lämplig m.o.i. (multiplicity of infection) uppnåddes. Viruset tilläts adsorbera till cellerna i 1-2 timmar, i +37°C. Cellerna sköljdes därefter med c:a 20 mL cellodlingsmedium innehållande 1-2% fetalt kalvserum per flaska. Cellerna intuberades i +37°C tills cpe (cytopatogen effekt) kunde påvisas.

Resultat; Cellinjer från normal vävnad som vero/MDCK-celler kan användas för odling av aviärt adenovirus men för att få en effektiv virus tillväxt krävdes flera passager för anpassning av viruset till den nya miljön. Till skillnad från de undersökta cellinjerna kunde kycklingembryo-njur/lever celler användas direkt för odling av kliniska material. Viktigt att ha i åtanke är att olika omgångar av samma cellinje kan ha olika känslighet då de under upprepade passager kan ha ändrat egenskaper, därför är regelbunden kontroll av cellinjers känslighet för avsett virus en viktig kvalitetskontroll. Vidare kan anpassning av viruset via en serie blind passager ändra viktiga egenskaper hos viruset vilket kan ha betydelser för det vidare karakteriseringsarbetet.

Två typer av cytopatogen effekter kan vanligen uppvisas efter 2-5 dagar; rundcellsdegeneration samt druvklasbildning. Druvklasbildningen är mer specifik för adenovirus och uppträder först i utlinjeringen av de hål i cellmattan som infektionen åstadkommer och i kanterna av cellmattan.

Kycklingembryolever celler visade sig vara den mest känsliga cellodlings modell för propagering av aviärt adenovirus (Bild 3).

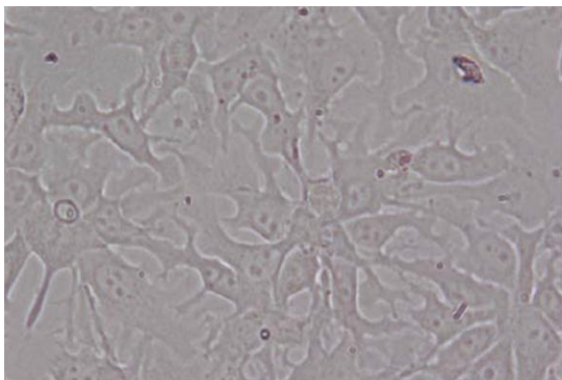
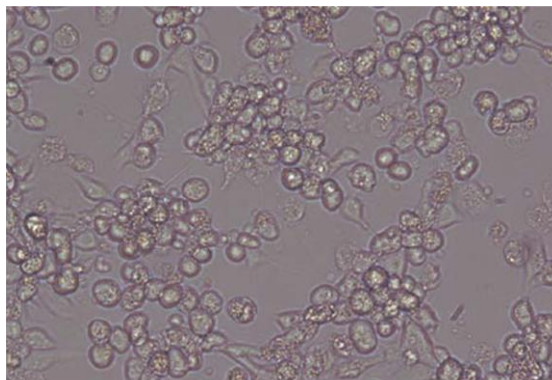


Bild 3. Normal, oinfekterad cell



Infekterad cell, 48 timmar efterinfektion med FadV-1 (CELO).

Identifieringen av isolatet görs enkelt med en direktmärkt fluorescerande antikropp riktad mot hexonproteinet – den medger således inte serotypbestämning.

Virus odling i befruktade ägg; Många laboratorier använder även befruktade hönsägg för odling av aviärt adenovirus.

Metodiken; Viruset (CELO-FadV-1) spädes till lämplig koncentration i lämplig antibiotikalösning. 9-12 dygn gamla befruktade hönsägg användes för propagering av viruset. 6 ägg per prov ympades, tre via allantois och tre via äggulan. Samtliga ägg placerades i +37°C. De ägg som ympades via allantois skördades efter 5 dygn medan äggen som ympades via äggulan skördades efter 7 dygn. Äggen genomlystes dagligen för att sortera bort döda ägg.

Resultat; Material från skördade ägg testades med specifik PCR för påvisande av aviärt adenovirus nukleinsyra. Virus kunde påvisas för ägg inokulerade med båda propageringsmodell från samtliga ägg.

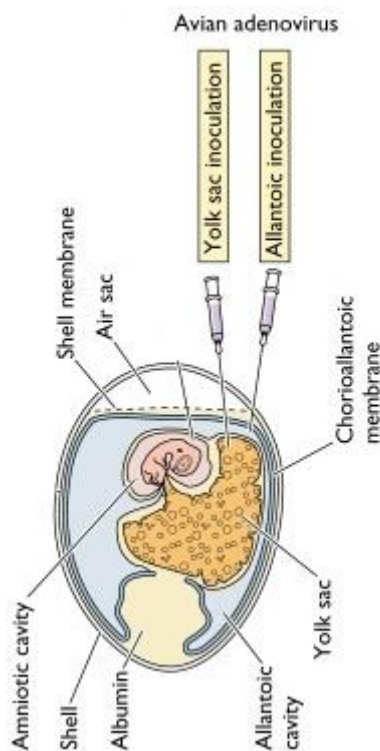


Bild 4. Olika modell för propagering av befruktade hönsägg.

Molekylär detektion; Känsliga och specifika metoder för att påvisa förekomsten av virus genom att visa på närvaron av nukleinsyra i kliniska prover används idag i ökande omfattning. Tekniker att studera arvsmassan kan också användas för epidemiologisk typning för påvisande av ursprung samt spridningsmönster i samband med utbrott. PCR-amplifiering har på senare år blivit en allt viktigare metod att tillgå som alternativ till odlingen.

Metodiken;

Huvudingredienserna för påvisande av arvsmassan med PCR-teknik är: enzymet DNA-polymeras, primrar (start sekvenser), fria nukleotider (dNTP) och templat dvs mål-DNA som skall påvisas. Den inbördes koncentrationen av dessa måste optimeras för varje PCR. Därtill kommer väl avvägd MgCl koncentration, och en buffert optimerad för att i

möjligaste mån gynna polymerasets aktivitet. PCR protokollen optimerades först genom att tillsätta olika mängder av de nödvändiga ingredienserna i en serie experiment, där extraherat DNA från referens virus för olika serotyper aviärt adenovirus (FadV1, 2, 4 & 8) användes som templat. Nukleinsyre-extraktionen utfördes i extraktionsrobot Magnatrix 8000 enligt tillverkarens instruktioner samt rutiner som används vid SVA's molekylärdiagnostisk laboratorium. Mix för PCR blandades enligt följande:

PCR reaktion mix (25µl reaktions volym)

Volym (µl) per reaktion	PCR
ddH ₂ O	9,71
10xPCR bufferII	2,5
dNTPmix [10 mM each]	0,5
MgCl ₂ [25 mM]	2,0
Primers [10 µM] Hex F	1
Primers [10 µM] Hex R	1
AmpliTaQ Gold [5U/µl]	0,14
Templat DNA	5,0
Totalt:	25µl

Rören med PCR mixen överförs till PCR- maskinen där proverna först hettas upp till ca 94°C för att separera strängarna i templatet (denaturering); därefter sänktes temperaturen till 60°C vilket möjliggör för primers att binda in till templatet (annealing). För att syntes av den nya DNA molekylen (elongeringen) ska fungera så bra som möjligt höjes efter annealingen temperaturen till ca 72°C vilket motsvarar den optimala temperaturen för DNA-polymeraset. Under en denaturering-annealing-elongerings-cykel så kommer DNA-polymeraset att syntetisera en ny komplementär kopia för varje templat-sträng. PCR cykeln upprepades ca 30 gånger. Proverna analyserades sedan på en 2 % -ig agarosgel (Bild5).

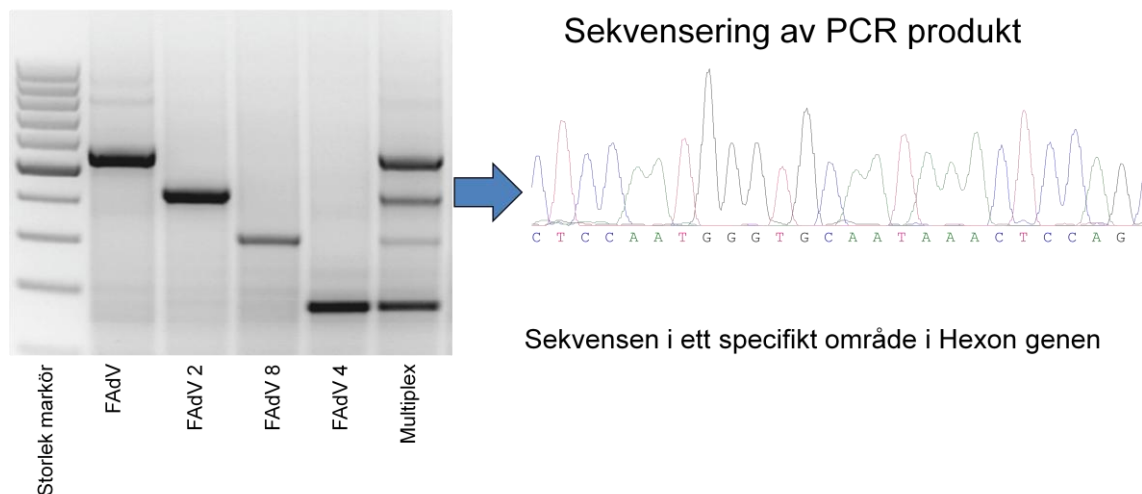


Bild 5. Molekylär detektions strategi för påvisande av aviärt adenovirus nukleinsyra och karakterisering.

Fylogenetisk trädanalys

Sekvensanalys, inklusive fylogenetisk trädanalys, är ett stort vetenskapsfält där det sker snabb kunskaps- och metodutveckling. När det gäller de flesta av metoderna för epidemiologisk typning, används vanligen någon form av mjukvara och databearbetning för att bilda dendrogram, släktskapsträd, och på så sätt avgöra släktskap mellan olika stammar. I vår analys användes trädkonstruktionsalgoritmen "maximum likelihood" i programmen MEGA 5.2.

Arbete med kliniska material

I den första delen av projektet arbetade vi för att få fram adekvat molekylär diagnostisk metodik samt lämpliga metoder för isolering och karakterisering av aviärt adenovirus, detta var en förutsättning för att kunna arbeta med kliniska material. Det kliniska materialet bestod av organmaterial (lever, mjälte, blindtarm, samt i få fall även muskel mage) insamlade av besiktningsveterinär i samband med slakt. Materialet förvarades vid -20 c vid slakteriet. Materialet sändes till SVA med början februari 2013, omedelbar anslutning till ankomst till SVA, förpackades materialet en och en och prover förbereddes för virus isolering samt den fortsatta undersökningen med PCR, samtliga material placerades därefter i -70 C frys.

Kartläggningen kom att omfatta tio besättningar samtliga slaktade vid ett slakteri under perioden november 2011 till februari 2013. Samtliga inskickade organmaterial undersöktes med den molekylär diagnostiska metoden samt användes för odling och isolerings försök av viruset. Nedanstående tabell sammanfattar resultaten (PCR-analys respektive odling) från undersökta kliniska material i anslutning till projektet.

	lever	Tarm	Muskel mage
Farm 1	X		
Farm 2	X		
Farm 3	X	X	
Farm 4	X	X	
Farm 5	X	X	
Farm 6	X		X
Farm 7	X		
Farm 8	X		X
Farm 9	X		
Farm 10	X	X	

	Post adress	Patologisk Diagnos	Virus isolering	PCR	Genotyp
Farm 1	27292	IBH	Neg.	Neg.	Neg.
Farm 2	29493	IBH	Neg.	Pos.	D
Farm 3	29493	IBH	Pos.	Pos.	D
Farm 4	27292	IBH	Neg..	Pos.	D
Farm 5	29476	(IBH)	Pos	Pos.	D
Farm 6	29493	(IBH)	Pos.	Pos.	D
Farm 7	27292	IBH	Pos.	Pos.	D
Farm 8	29493	IBH	Pos.	Pos.	D&E
Farm 9	29493	IBH	Pos.	Pos.	D
Farm 10	29477	IBH	Pos.	Pos.	D

Diskussion

Odling av virus är ofta en mycket arbetsintensiv verksamhet som kan ta lång tid att utföra. Att kunna använda cellinjer kan underlätta arbetet då det finns kontinuerlig tillgång till celler och virusisolering vilka kan påbörjas ganska omgående. Nackdelen är att virus i kliniskt material måste adopteras till cellerna genom en serie av blind passenger. Primära celler har visat sig vara mer känsliga för isolering av FadV men nackdelen är att framtagning av sådana celler är mycket arbetsintensivt och tillgången till organ material för produktion av dessa celler är begränsat. Isolering i befruktade hönsägg visade sig vara lika känslig som isolering på celler. **Vi rekommenderar därför att man använder befruktade**

ägg i första hand vid virus isolering i samband med undersökning av kliniska material och övergår till fortsatt odling på celler för att få en stor mängd enhetligt virus för vidare karakterisering. Virus kunde isoleras från 7 av tio undersökta farmar och i de allra flesta fall från samtliga undersökta organ (tarm/lever/muskelmage). Ett framgångsrikt virus isolerings försök visade sig ha ett direkt samband med förvaringstiden samt kvalitén på det undersökta materialet. Långtids förvaring av organ i -20 grader minskar väsentligt chansen att kunna isolera virus från materialet.

Traditionellt sätt för att karakterisera aviärt adenovirus serotyper är neutralisation test. Denna är tidskrävande och baseras på en kombination av virusodling på celler och neutralisering med typspecifika antikroppar. Olika typer av genomkarakterisering på DNA-nivå har ersatt den klassiska serotyp karakteriseringen och idag talar man oftare om genotyper än serotyper. I projektet valde vi att karakterisera aviärt adenovirus typerna på genomnivå med hjälp av direkt sekvensering av PCR-amplifierat fragment.

Eftersom flera serotyper ([serotyp 2, 3,8] [7 & 11]), av aviärt adenovirus är förknippat med sjukdomen IBH försökte vi i första hand rikta vår PCR mot de specifika serotyperna (Bild5). Men med en sådan strategi finns det dels risk att missa positiva fall om IBH är orsakade av en nysero typ av adenovirus samt kräves att flera PCR system används parallellt för att kunna upprätthålla diagnostiken. I vårt fall valde vi att rikta vår PCR mot Hexon loop L1 genen eftersom det är viktigt att rikta in sig på en konserverad region för att öka chansen till att alla genotyper kan amplifieras med ett och samma PCR-system.

Fördelen med denna strategi är att direktsekvensering av ett amplifierat och därmed begränsat fragment är snabbast och enklast.

PCR undersökningen visade sig vara känsligare än virusodlingen. Detta kan delvis förklaras med att en del av proverna har förvarats länge i -20 innan vilket kan ha resulterat att viruset inte längre är levande, däremot kan spår av arvsmassan kan ändå detekteras.

Den fylogenetiska analysen visade på **förekomst av två genotyper av aviärt adenovirus hos de undersökta slaktkycklingarna** (Bild 6). Genotyp D (serotyp2) var den dominerande varianten och kunde påvisas i nio av tio de undersökta fallen. FadV genotyp E (serotyp8a) kunde påvisas i ett fall.

De kliniska material som undersöktes under projektets gång var alla insamlade på samma slakteri där besiktnings veterinären upptäckte för hög kassation samt kraftiga förändringar i olika organ vid rutin kontrollen. Den preliminära diagnosen baserades på anamnes och den mikroskopisk/patologanatomisk undersökningen. I de flesta fall kunde vi bekräfta den patologanatomiska diagnosen med hjälp av molekylär- och virus diagnostiska metoder. Dock inte i prover undersökta från farm 1, där med hjälp av den mikroskopisk/patologanatomisk undersökningen sjukdomen IBH kunde konstateras men närvaro av virus inte kunde påvisas i våra undersökningar. Detta kan förklaras med den långa förvarings perioden innan våra undersökningar. I undersökta prover från farm 5 och farm 6 kunde vi påvisa både med molekylär diagnostiska metoder samt virus isolering på förekomst av aviärt adenovirus genotyp D-serotyp 2. Proverna från farm 5 var insamlade i samband med slakt på 34 dagar gamla slaktkycklingar med förhöjd dödlighet (3,7%) samt höga kassationer (3,57%) vid slakt. I detta fall kunde inte den mikroskopisk/patologanatomisk undersökningen säkert konfirmera diagnosen IBH. Materialet från farm 6 var insamlade i samband med slakt av 34 dagar gamla slaktkycklingar med konstaterat ojämn tillväxt samt hög kassation i vid slakt. Vid patologanatomiska undersökningar kunde inte diagnosen IBH fastställas då inga typiska inklusionskroppar tydande på IBH påträffades i något av de undersökta levermaterialen.

Sekvensering av PCR positiva prover från farm 8 visade på förekomst av två genotyper av FadV i samma besättning (Bild 6). Sekvensen av prover från muskelmage tillhörde genotyp E (serotyp8a) medan sekvensen på prover från tarm tillhörde genotyp D (serotyp 2). Prover var tagna på grund av ökad dödlighet och dålig tillväxt. Vid obduktion

konstaterades stora ljus gulaktiga leverar med blödningar. I den mikroskopiska undersökningen påträffades inflammation runt blodkärl (lymfocyter och heterofila granulocyter) i samtliga undersökta lever prover. Dessutom konstaterades en uttalad akut hepatocellulär vakuolär degenereration och nekros med diffus utbredning. I flera prov sågs enstaka inklusionsliknande strukturer, men diagnosen IBH kunde inte säkert bekräftas. I muskelmage konstaterades lindrig purulent inflammation i övre delen av epitelet under koilinskiktet. Koilinskiktet var tunnare än normalt och med uppluckrad struktur och innehöll degenererade epitelceller. I övre halvan av koilinskiktet sågs växt av kockoida bakterier i sparsam till riklig mängd.



Bild 6. Fylogenetiska relationer mellan representanter från samtliga genotyp av FadV och dem cirkulerande adenovirus i Sverige

Slut ord; Generellt kan virologiska/molekylärepidemiologiska undersökningar vara ett bra kompletterande verktyg till patologiska/histologiska undersökningar vid misstanke av aviärt adenovirus. Hittills har diagnosen i samband med misstankar om IBH utbrott baseras enbart på histologi. Klara förändringar i levern och histopatologiska fynd har legat för grunden för fastställande av diagnosen. I projektet använde vi konventionell PCR för att mångfaldiga en del av hexon-genen i FadV, för att med hjälp av direkt cykelsekvensering bestämma DNA-sekvensen i genen. När man har DNA-sekvensen kan man genom att applicera den genetiska koden på sekvensen avgöra ursprung och spridningsmönster i samband med utbrott. Med hjälp av de fram arbetade metoderna inom projektet har vi nu möjlighet till isolering av virus samt genetisk Karaktärisering av sjukdomsframkallande adenovirus i svenska slaktkycklingbesättningar.