

Kurering av virulensplasmider i fågelbotulismisolat för att skapa vaccinstamskandidater

H1043284

Slutrapport

Bo Segerman

Bakgrund

Svenska fjäderfäbesättningar drabbades första årtiondet på 20-hundratalet av en markant uppgång av botulismutbrott. Med anledning av detta genomfördes en karaktärisering av de genetiska egenskaperna hos den sjukdomsframkallande bakterien år 2008-2010 (projekt, Helgenomisk karaktärisering av isolat från fågelbotulismutbrott). I detta projekt framkom att bakterien, utöver det välkända botulinum-toxinet även bär på en uppsättning av andra gener som kan fungera som toxiner/virulensfaktorer. Dessa fanns framförallt lokaliserade på så kallade plasmider, en slags mini-kromosom som ofta kan förflytta sig mellan bakteriestammar. Det är känt att fåglar är relativt motståndskraftiga mot botulinumtoxinet jämfört med många andra djur och resultaten av den första studien ledde till hypotesen att bakterien är beroende av flera toxiner/virulensfaktorer för ge en tillräckligt effektiv infektion i fåglar för att orsaka utbrott. Med anledning av detta ville vi genomföra detta projekt där vi tagit bort botulinum-toxinet och även ytterligare toxiner/virulensfaktorer för att på så sätt skapa bakteriestammar som skulle kunna ge subklinisk infektion och därmed leda till ett immunologiskt skydd mot efterföljande exponering av botulinum-stammar.

Botulism hos fjäderfä

Botulism är en sjukdom som orsakas av botulinumneurotoxinet ofta förkortat som BoNT. Detta toxin är ett protein som tas upp i kroppen och som stör nervernas funktion så att förlamning uppstår. Botulism är oftast en förgiftning snarare än en infektion. Konsumtion av redan färdigbildat toxin leder till sjukdomssymptomen. Botulism hos fjäderfä anses snarare vara en s.k. toxikoinfektion, där djuren blir sjuka först efter att sporer av *Clostridium botulinum* har växt till sig i tarmen hos fåglar och bildat aktivt botulinumtoxin. Fåglar som drabbas av botulism blir allmänt ovilliga att röra sig och vill mestadels ligga ner. Om de reser sig rör de sig vingligt med okoordinerade rörelser, hänger med vingarna och har svårt att hålla huvudet upprätt. Allteftersom paralyseringen fortskrider får djuren svårare att andas och blir helt förlamade med hängande huvud och dör tillslut. Både vilda och tama fåglar kan drabbas av botulism.

Fjäderfäbotulism i Sverige

Under åren 2003-2009 förekom ett antal omfattande utbrott av botulism och detta har gett upphov till betydande konsekvenser för de drabbade uppfödarna. De senaste åren verkar dock läget ha förbättrats något. Det kan bero på ett lägre smittryck, men kan också vara kopplat till tidiga åtgärder för att hindra att ett fullskaligt utbrott byggs upp. En teori är att tidig lokalisering och avlägsnande av botulismdrabbade fåglar ska kunna hejda uppkomsten av ett stort utbrott och få bakterien att dö ut.

Bakterien som orsakar botulism

Botulism orsakas av sporbildande, gram-positiva bakterier inom släktet *Clostridium*, som bär på botulinumneurotoxigenen. Denna toxigenen har genom historien på olika sätt flyttats över mellan bakterier som är så pass olika varandra att de egentligen kan ses som olika arter. Trots deras ibland kraftigt åtskiljda genetiska bakgrund brukar alla samlas under namnet *Clostridium botulinum*. Det finns tre huvudsakliga grupper av bakterier som orsakar botulism. Grupp I och grupp II orsakar botulism hos framförallt människor och grupp III hos djur. Det finns även några mindre vanliga grupper där fallen är mer sällsynta. Komplexiteten ökas på ytterligare av det faktum att det finns

olika varianter av toxingenen som brukar benämnas typ A-F. Problemen i fjäderfäbesättningar orsakas av bakterier från grupp III. Denna grupp bär på botulinumtoxiner av toxin-typerna C, D, C/D eller D/C. Formerna som benämns C/D och D/C är hybridformer där halva genen liknar C-typen och andra halvan D-typen. Framförallt toxin-typ C/D är vanlig på fåglar. Grupp-III bakterierna är inte så lika de av grupp I och II som orsakar botulism hos människa, men är däremot mycket lika bakterier från arterna *Clostridium novyi* och *Clostridium heamolyticum*. Dessa två arter orsakar andra allvarliga problem såsom gasbrand hos djur såväl som på människa.

Infektionsmodeller med *C. botulinum*

Två tidigare infektionsstudier på kycklingar med *C. botulinum* grupp III sporer har utförts och beskrivits i tidskrifter (Miyazaki and Sakaguchi 1978; Hyun and Sakaguchi 1989). I båda fallen användes botulinumtoxinbildande bakterier (i sporform) och samtliga djur dog inom 13 dagar. Doserna som användes var 10-1000, respektive 10^7 sporer/djur. I den ena studien visades att vissa fåglar fick botulism av doser ända ner till 10 sporer per djur och att 100 sporer per djur gav botulism i alla använda försöksdjur. Avsnörning av blindtarmen gav okänslighet mot sporer vilket visar att tillväxt i blindtarmen är viktig. I den andra studien visades att om djuren gick på galler blev de inte sjuka vilket tyder på att recirkulering av sporer via ströbädden/träck är en viktig faktor i sjukdomsförloppet. Eftersom studierna gjordes för så länge sedan har vi inte kunnat få fram en detaljerad beskrivning hur djuren hölls.

Plasmider och virulensfaktorer

I våra studier har vi funnit att de bakteriestammar som orsakar fågelbotulism bär på ovanligt många plasmider (fristående genetiska enheter som fungerar som en slags mini-kromosom) och många av dem kodar för olika virulensfaktorer. Vi har funnit mellan 4 och 6 olika plasmider i fågelbotulismisolat. Botulinumtoxinet är en av de plasmidburna virulensfaktorerna men det finns även andra toxingener och potentiella virulensfaktorer. Vår hypotes är att dessa virulensfaktorer tillsammans skapar förutsättningar för en effektiv toxikoinfektion. I tabell 1 summeras de plasmider som vi har identifierat i fågelbotulismisolat och vilka toxiner/möjliga virulensfaktorer de bär på.

Tabell 1. Plasmider i fågelbotulismisolat

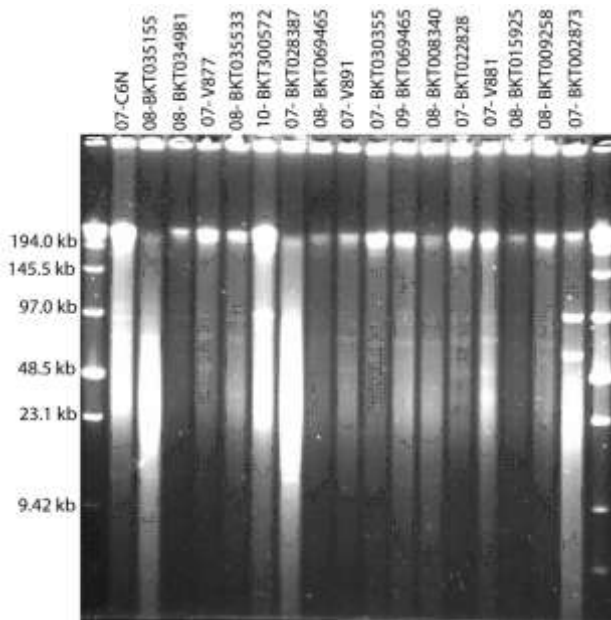
Plasmid	Toxin/virulensfaktor
P1	Botulinumtoxin, C3-toxin
P2	Alfa-toxin, Clostripain
P3	C2-toxin, Fosfolipas C
P4	-
P5	Epsilon-toxin
P6	Bacteriocin

Material och Metod

Metoder för plasmidscreening av isolerade stammar

För att kunna uppskatta plasmiduppsättningarna hos våra isolerade stammar har vi optimerat en pulsfälts-gelelektrofores (PFGE)-baserad metod som visar plasmiderna som band på en agarosgel.

Plasmiderna är ibland mycket stora och DNA från dessa bakterier är oftast av sämre kvalitet beroende på enzymer som frigörs och partiellt förstör DNA när vi öppnar cellerna. Detta leder till att banden blir otydligare i denna typ av analys trots optimerande åtgärder. I figur 1 visar vi en PFGE-plasmidanalys av fågelbotulismisolat.



Figur 1: PFGE analys av plasmider

Som komplement till PFGE-metoden satte vi även upp en polymeraskedjereaktion (PCR)-baserad analys för detektion av plasmiderna P2-P6. Det finns redan publicerade detektionsmetoder för P1 (Lindberg, Skarin et al, 2010). En PCR-analys påverkas mindre av skador på DNA och har en hög känslighet. Det sekvensmaterial som projektet " Helgenomisk karaktärisering av isolat från fågelbotulismutbrott" levererade gav oss möjligheter att skapa dessa riktade plasmid-analysmetoder. Startsekvenserna som utgör basen i analyserna redovisas i tabell 2. För att upptäcka nya plasmider behöver vi dock använda PFGE- metoden.

Tabell 2 PCR baserad detektion av plasmider

Plasmid	Gen	Produktstorlek	T (°C)	ID	Startsekvens
P2	alfa-toxin	346	60	p20034_L	cagatggaatagttggacctga
				p20034_R	ttgcacgatatccttcagca
P2	clostripain	300	60	p20035_L	cagatggaatagttggacctga
				p20035_R	gccaccatggtttgacatta
P2	hypotetiskt protein	355	59	p20103_L	aatatggctgcaacaacaaaaa
				p20103_R	gctaggcatttctacccttc
P2	hypotetiskt protein	396	60	p20003_L	tgcaaaggatttaaataagca
				p20003_R	tgcttaaacatatccgcact

P3	c2 toxin	378	60	p30035_L	tgactttatcaataaacctgaatct
				p30035_R	aatagctgactcaggaattatagaa
P3	hypotetiskt protein	469	60	p30001_L	gacagctggatgcaactcaa
				p30001_R	tcttcatccccatagaaataatctg
P3	hypotetiskt protein	385	60	p30002_L	tggcaaatttagtgctgctg
				p30002_R	tggcaaatttagtgctgctg
P4	casenolytiskt proteas	393	60	p40028_L	ttggtggacaggaaggaag
				p40028_R	tcccctatttccccacaaa
P4	plasmid segregationsprotein	348	60	p40004_L	tcattcaaggcaatggtgaa
				p40004_R	cgctcttattgtcaagcaa
P4	plasmid replikationsprotein	425	60	p40003_L	gggattctattcttgcttataa
				p40003_R	ttgtatggctctggcaactg
P5	epsilon-toxin	453	60	p50009_L	attggacagccgacgattac
				p50009_R	aggatgaccacctggatttg
P5	fag-relaterat protein	350	60	p50002_L	ttgattggataactgaagtagga
				p50002_R	gctgtccttactggtgttg
P5	hypotetiskt protein	324	60	p50003_L	tggaagaaaagatgttccaagt
				p50003_R	tttccttcccatgtacaatct
P6	bacteriocin	439	59	p60030_L	cagatggaatagttggacctga
				p60030_R	cctgtttatcctccttga
P6	hypotetiskt protein	420	59	p60001_L	gggattctatggttgcttatt
				p60001_R	gcatgattctggcaactgttatt
P6	hypotetiskt protein	303	60	p60082_L	aagctgccacctgcttta
				p60082_R	gttttattttggaggaatgga

Framtagande av vaccinstammar

Vår hypotes är att genom att ta bort någon eller några av dessa plasmider från en stam kan vi minska virulensen och skapa en stam som ger subklinisk infektion, vilken sedan ger ett skydd mot senare exponering av fågelbotulismbakterier. Botulinumtoxingenen skall inte vara kvar i en sådan vaccinstam men förhoppningen är att ett immunologiskt svar mot någon eller några av de andra virulensfaktorerna kan ge ett skydd mot infektion.

Vi satte upp ett kureringsprotokoll baserade på värme och novibiocin-behandling i tillväxtfasen av bakterierna. Upphettning innebär att bakterierna stressas så att de plasmider som har virusegenskaper lämnar bakterierna. Novibiocin saktar ner replikationshastigheten hos plasmider så att de inte hinner dela sig i samma hastighet som cellen delar sig. På så sätt uppkommer en viss

delmängd "kurerade" bakterier (som saknar en eller flera plasmider) och genom att så ut och analysera slumpvis utvalda kolonier på odlingsplattor kan man få fram nya varianter av bakterien som saknar plasmider och därmed även toxiner/virulensfaktorer.

Vildtypsstammen innehållande samtliga plasmider P1-P5 testades positiv för produktion av aktivt botulinumtoxin med hjälp av Endopep-masspektrometri (Endopep-MS) (Tevell Aberg, Bjornstad et al. 2013). Med hjälp av den metoden kan man detektera toxinets klyvningsprodukter vilket gör att man säkert kan säga att provet innehåller ett specifikt aktivt toxin.

Sporer bereddes först av de tre stammarna (de två reducerade samt vildtypsstammen) enligt tidigare beskrivet protokoll (Lindberg, Skarin et al. 2010). Koncentrationen av sporer bestämdes med hjälp av "most probably number-metoden" (MPN), vilket i praktiken innebär att man gör spädningar av provet och sedan analyserar vilka spädningar som gett upphov till bakterietillväxt.

Därefter bereddes sporer också utan reningsmoment för att minimera risken att påverka sporernas ytskikt under sporpreparationen.

Infektionsmodellen

Djuren anlände till SVA som daggamla kycklingar (slaktkycklingar från svenskt kläckeri) och placerades på ströbädd i två specialkonstruerade golvförsedda stålburar á 7200 cm² (0,72 m²) med värmelampor i SVAs djurhus (Figur 2). Motsvarande burar användes under hela experimentet. Märkning och uppdelning av kycklingarna i grupper om 10 djur i åtta burar i tre separata rum skedde vid en veckas ålder. Kycklingarnas miljö efterliknade i största möjliga mån den i kommersiell uppfödning genom att de gick på ströbädd, hade fri tillgång till mat och vatten samt reglerad temperatur och ljusinsläpp. Det foder som användes valdes i samråd med produktansvarig för fågelfoder hos Lantmännen. Både start- och tillväxtfodret efterliknade kommersiellt slaktkycklingfoder i näringsinnehåll men saknade koccidostatika. Det innebär också att kycklingarna skulle avlivas vid fem veckors ålder då de nått sin produktionsvikt. De fick daglig tillsyn och vård och skötsel enligt fastställda rutiner vid SVAs djuravdelning och detta utfördes av behörig personal. Hälften av ströbädden byttes ut en gång i veckan av sanitära skäl.

Tre stam-upsättningar av *C. botulinum* (fågelbotulismvarianten) testades i de primära försöken, två reducerade stammar (innehållande P2-P5, respektive bara P2) samt en positiv kontroll (fullt virulent stam med P1-P5). En negativ kontroll användes också (inga bakterier). Två olika infektionsdoser, 10³ och 10⁶ sporer, testades. Varje testgrupp innehöll 10 djur placerade i separat bur. Primära infektionsdoser administrerades oralt i volymen 0.5 ml med spruta i en vecka gamla kycklingar. Kycklingar injicerade med negativ kontroll var placerade i ett rum, kycklingar injicerade med reducerade stammar i ett annat rum och kycklingar injicerade med den fullt virulenta stammen var placerade i ett tredje rum. Därefter observerades djuren två gånger dagligen med minst åtta timmars mellanrum för uppvisande av botulismsymptom. Planen var att avliva djuren så fort tydliga kliniska symptom/påverkan av allmäntillståndet uppkom. Loggjournaler samt en detaljerad symptombeskrivning fanns i alla tre rummen för att kunna upptäcka tidiga sjukdomssymptom och då avliva djuren. Genom tillsyn av djuren två gånger dagligen var tanken att öka chanserna att upptäcka tidiga botulismsymptom och därmed minska onödigt lidande. Förväntningarna var sådana att vildtypsstammen (positiv kontroll) skulle orsaka botulism. Symptomen från de modifierade isolaten är inte kända men förväntades vara lindrigare än det fullt virulenta isolatets.

Vid två veckors ålder injicerades två nya grupper med kycklingar med 10^6 sporer av den senare batchen av vildtypssporer där sporerne utsatts för mindre rening för att minimera påverkan, respektive en ny batch beredd enligt tidigare protokoll.

Under infektionsförsöket samlades träckprover in från rummet med positiv kontroll och testades för påvisning av botulinumsporer enligt Lindberg, Skarin et al, 2010.

Avlivning och Provtagning

Samtliga fåglar avlivades vid 4,5 veckas ålder med hjälp av avlivningsvätska. I samband med avlivning av fåglarna togs blodprov och blindtarmar ut från alla fåglar injicerade med vildtypsstammen. Blodet centrifugerades samma dag och serumet analyserades för detektion av aktivt botulinumtoxin med hjälp av Endopep-MS. Blindtarmar analyserades för förekomst av *C. botulinum*-sporer av vildtypsstammen enligt Lindberg, Skarin et al, 2010.

Resultat

Med hjälp av PFGE-och PCR-metoderna har vi screenat våra tillgängliga isolat och kartlagt de naturliga plasmidvariationerna. Den variant av botulismbakterie som orsakat majoriteten av problemen i Sverige har mellan 4 och 5 plasmider.

Vi använde kureringsprotokollet på den utvalda stam som innehöll flest antal plasmider och som var isolerad från ett botulismutbrott på svensk slaktkycklinganläggning. Vi fick fram en panel med modifierade isolat där enstaka eller en kombination av virulensbärande plasmider saknades (tabell 3). Stam 1 och 5 valdes ut som vaccinkandidater för infektionsmodellen.

Tabell 3. Stammar med varierad plasmiduppsättning

	P1	P2	P3	P4	P5
Stam1	-	+	+	+	+
Stam2	+	+	+	-	+
Stam3	-	+	+	-	+
Stam4	+	+	+	-	-
Stam 5	-	+	-	-	-
Stam 6	-	+	+	-	+

Vi ville undersöka hur virulensen har påverkats för de modifierade isolaten samt om de kunde ge ett skydd mot efterföljande exponering av ett fullvirulent isolat. Infektionsförsöken skedde vid enhet för virologi, immunbiologi och parasitologi i SVAs djurhus. Djuren anlände till SVA som daggamla kycklingar och placerades på ströbädd i två stålburar (Fig. 2).



Figur 2. Daggamla kycklingar har just anlänt till SVAs djurhus och placerats i specialkonstruerade burar. Motsvarande burar användes under hela experimentet.

Fyra dagar efter infektion kunde sporer påvisas i träck från de kycklingar som injicerats med den högre dosen av vildtypsstammen, medan sporer ej påvisades i träck från fåglar injicerade med den lägre dosen. Efter en vecka fick vi samma resultat. Efter vecko-städningen kunde vi inte längre påvisa sporer i träck hos infekterade fåglar, vilket tydde på att sporerne ej hade växt i kycklingarna. Efter två veckor hade fortfarande inga kycklingar visat några tecken på botulismsymptom, varken de injicerade med den virulenta vildtypsstammen eller med de reducerade stammarna.

Vid avsaknad av botulismsymptom vid två veckors ålder förbereddes en ny sporuppsättning av vildtypsstammen. Den här gången bereddes sporer utan reningsmoment för att minimera risken att påverka sporerens ytskikt under sporpreparationen. Vid två veckors ålder injicerades två nya grupper med kycklingar med dessa sporer, respektive en ny batch beredd enligt tidigare protokoll. Anledningen till att vi administrerade sporer som beretts enligt tidigare protokoll var att vi inte visste om åldern kunde ha någon påverkan på förloppet. Efter ytterligare 10 dagar avlivades samtliga fåglar utan att några botulismsymptom uppvisats heller i de grupper som blivit injicerade i andra försöket. Inga symptom av nedsatt hälsa visades heller bland kycklingar injicerade med vaccinstammar eller negativ kontroll.

Samtliga serumprov var negativa för botulinumtoxin. Samtliga blindtarmar var negativa för botulinumsporer.

Diskussion

Genom detta projekt har vi fått ökade kunskaper om de stammar som orsakat botulism i slaktkycklingbesättningar de senaste åren. Vi vet nu att de flesta stammarna bär på en stor uppsättning plasmider, men att det skiljer sig åt mellan närbesläktade isolat. Den informationen är i sig värdefull för epidemiologiska studier.

Målsättningen under infektionsförsöken var att efterlikna miljön på en slaktkycklinganläggning i mesta möjliga mån. Försöksrummen har dock höga krav på att smittämnen inte skall kunna spridas

och utgör därför ofrånkomligen en onaturligt steril miljö. Äldre tiders försöksrum var troligen mindre sterila än de som används idag. I de två tidigare japanska infektionsstudier som finns dokumenterade där djuren blev sjuka av botulism beskrivs djurens levnadsförhållanden knapphändigt.

I vår infektionsmodell växte inte sporer till sig i kycklingarna och slutsatsen vi kan dra i och med det är att det krävs fler faktorer än enbart ett introducerande av botulinumsporer i slaktkycklingmiljön för att djuren ska bli sjuka. Detta i sig är en viktig och ny kunskap då man tidigare, baserat på litteraturen, kunnat utgå ifrån att kycklingar blir sjuka om botulinumsporer i tillräckligt hög grad finns närvarande i deras omgivning. Båda doserna av sporer vi testade var fullt tillräckliga för att orsaka botulism enligt tidigare infektionsmodell och vi tror därför inte att djuren hade blivit sjuka om vi ökat infektionsdosen. Vi vet också att den vildtypsstam som användes i detta försök som isolerades från ett utbrott i slaktkycklingbesättning så sent som 2008 har kapaciteten att orsaka botulism då den virulensbestämde innan försökets början.

Då själva infektionsmodellen inte fungerade gick det inte att testa effekterna av de framtagna vaccinkandidaterna. För att kunna göra detta måste det undersökas vilka faktorer i kycklingarnas miljö som bidrar till ökad risk för botulism. Detta är ett stort åtagande och måste hamna inom ramarna för ett nytt forskningsprojekt. Möjliga faktorer som skulle kunna spela in för om sporer växer till sig i kycklingtarmen är; pH i foder och i tarmen, bakteriesammansättning i tarmen, stress, ströbäddens och den allmänna miljöns renhet, foder och vattenautomaters utformning.

Slutsatser

- De stammar som isolerats från svenska fjäderfäutbrott innehåller en stor men varierande mängd virulensbärande plasmider
- Enbart ett introducerande av botulinumsporer i en kontrollerad försöksdjursmiljö räcker inte för att djuren ska bli sjuka
- Ytterligare forskning bör bedrivas om hur djurens levnadsförhållanden påverkar risken för uppkomst av botulism

Resultatförmedling till näringen

Det krävs fler faktorer än enbart ett introducerande av botulinumsporer i slaktkycklingmiljön för att djuren ska bli sjuka av botulism. Det är möjligt att miljöfaktorer och sammansättning av foder kan påverka tillväxten av botulinumsporer i tarmen hos fåglarna. Riskfaktorer bör utredas ytterligare för att ta fram åtgärder mot botulismutbrott.

Referenser:

Hyun, S. H. and G. Sakaguchi (1989). "Implication of coprophagy in pathogenesis of chicken botulism." Nihon Juigaku Zasshi **51**(3): 582-586.

- Lindberg, A., H. Skarin, et al. (2010). "Real-time PCR for Clostridium botulinum type C neurotoxin (BoNTC) gene, also covering a chimeric C/D sequence--application on outbreaks of botulism in poultry." Vet Microbiol **146**(1-2): 118-123.
- Miyazaki, S. and G. Sakaguchi (1978). "Experimental botulism in chickens: the cecum as the site of production and absorption of botulinum toxin." Jpn J Med Sci Biol **31**(1): 1-15.
- Tevell Aberg, A., K. Bjornstad, et al. (2013). "Mass spectrometric detection of protein-based toxins." Biosecur Bioterror **11 Suppl 1**: S215-226.