

## Slutrapport projektnummer V0750245.

### ***Lawsonia intracellularis* –en viktig sjukdomsframkallande bakterie med okänd verkningsmekanism.**

#### **SYFTE**

Det övergripande syftet är att undersöka de mekanismer som leder till sjukdom vid infektion med bakterien *Lawsonia intracellularis*. Kunskap om hur bakterien infekterar tarmens slemhinna och vilka delar av kroppens immunsystem som aktiveras vid infektion är nödvändiga om bra förebyggande åtgärder som till exempel effektiva vacciner skall kunna utvecklas. Vidare är det viktigt att erhålla ökad kunskap om olika behandlingsmetoder. Ovanstående kan uppnås genom följande, specifika delmål:

1. Etablering av metoder för att odla *L. intracellularis*.
2. Utveckling av en reproducerbar infektionsmodell med bakterien.
3. Studier av specifika parametrar i immunsvaret i relation till tarmskador före, under och efter en experimentell infektion, liksom resultatet av behandling. Detta kan göras tack vare en unik porcin modell vilken tidigare utvecklats vid institutionen.

Denna ansökan avser medel till utrustning.

#### **BAKGRUND**

Diarrésjukdomar är ett mycket stort problem inom grisproduktionen både nationellt och internationellt (1, 2). Sjukdomarna orsakar lidande hos det enskilda djuret likväl som stora ekonomiska förluster för lantbrukaren (2, 3). Sjukdomen proliferativ enteropati orsakas av bakterien *Lawsonia intracellularis*, vilken lever inuti tarmväggens celler. Den orsakar kliniska symptom som diarré, dålig tillväxt, tarmblödningar och plötsliga dödsfall hos växande grisar med avsevärda produktionsförluster som följd (3, 4). Minst 48 % av de svenska, smågrisproducerande besättningarna bedöms vara infekterade (5). Diagnostik av sjukdomen baseras på tekniker som PCR, obduktion och serologi (6).

Väl kontrollerade, experimentella studier är nödvändiga för att erhålla kunskap om smittspridning, sjukdomsförlopp, hur infektionen sker och hur kroppens immunsystem reagerar. Dessa kunskaper krävs för att kunna identifiera bra förebyggande åtgärder och lämplig behandling. I projektet skall kunskap genereras genom följande delmål: 1). Etablering av metoder för att odla bakterien. 2). Utveckling av en experimentell infektionsmodell med användande av ett kontrollerat inokulat i en bestämd infektionsdos. 3). Studier av specifika parametrar i immunsvaret i relation till tarmskador före, under och efter infektion liksom resultat av behandling, med hjälp av en unik porcin modell som utvecklats vid institutionen och baseras på endoskopi av tarmen via en tarmfistel.

Bakterien är mycket svår att odla och detta görs för närvarande endast vid två-tre laboratorier i världen (8). Bakterien odlas inuti kommersiellt tillgängliga celler, så kallade IEC-18 eller McCoy, i speciella flaskor under mycket specifika gaskoncentrationer (så kallad mikro-aerofil miljö). I denna ansökan söktes och erhöles medel för utrustning som bedömdes som

nödvändig för att genomföra delmål 1) ovan. Metoden som utvecklats i delmål 1) skall sedan tillämpas i delmål 2) och 3). Lönemedel för dessa studier har tidigare erhållits från FORMAS.

## **MATERIAL och METODER samt RESULTAT, delmål 1).**

Ansökan insändes i januari 2007 och beviljades i mars med beslutat utbetalningsdatum november 2007.

I september 2007 framställdes filtrat från fyra olika tarmprov, vilka tidigare bedömts som positiva med PCR. Filtraten framställdes genom homogenisering och filtrering genom membran-filter med successivt minskande porstorlek (1.2 µm, 0.8 µm och 0.65 µm). Filtraten frystes ned i -70°C.

Under september-oktober 2007 gjordes också försök att odla bakterien från ovanstående filtrat i så kallade anaerob-klockor avsedda för odling av *Campylobacter*, men dessa försök misslyckades.

I november 2007 erhöles medel från SLF och en begäran om offert gick ut till de företag som säljer odlingskåp (s.k. "anaerobic chambers") till Sverige.

Ett odlingskåp (Shel Lab Bactron) avsett för anaerob odling inköptes från Houm AS, Norge. Gastuber (2 st med s.k. bärrar-gas och 2 st. med den specifika gasblandning som krävs för odling av *Lawsonia*), slangar och regulatorer inköptes från AGA gas. Systemet installerades i april 2008 med hjälp av personal från Houm AS.

En så kallad monoklonal antikropp, som används för att specifikt märka in *Lawsonia*-bakterier, erhöles från Svanova biotech AB.

I april påbörjades försök med inmärkning/färgning av två av ovanstående tarmfiltrat/isolat med hjälp av den monoklonala antikroppen, i syfte att fastställa optimala koncentrationer av de olika reagenserna. Därefter påbörjades försök med odling av tre av ovanstående fyra isolat. Dessa odlades på en kommersiell cellinje (McCoy-celler) vilka köptes från SVA. Som odlingsmedium användes ett kommersiellt substrat, DMEM, med och utan tillsats av antibiotika (gentamicin, vancomycin och amphotericin B) för att förhindra förorening med andra, mer lättodlade bakterier, samt med extra tillsats av tillväxtbefrämjande substanser (1% L-glutamin och 0.8 % FCS). Odlingskåpet möjliggjorde optimala odlingsförhållanden med en konstant temperatur på 37°C, i en atmosfär bestående av 8 % O<sub>2</sub>, 8,8 % CO<sub>2</sub> och 83.2 % N<sub>2</sub>. Odlingsmedia byttes varannan - var tredje dag och mikroben passerades (=överfördes till nya, färska McCoy-celler) en gång per vecka.

Två olika metoder för att infektera cellerna jämfördes och slutsatsen var att sex timmars inkubering med isolatet utan antibiotika gav en kraftigare infektion jämfört med infektion med hjälp av centrifugering, men inkubering utan antibiotika ökade samtidigt risken för föroreningar. Vidare sågs en stor skillnad i växt mellan de tre olika isolaten, när de hölls under i övrigt identiska förhållanden. I dessa första försök gick det dock bara att hålla bakterierna i odling under två passager, därefter var samtliga odlingar förorenade.

I september påbörjades försök med odling av en kommersiell vaccin-stam i syfte att utvärdera optimal metod för att genomföra passagera. Fyra olika metoder jämfördes: passage med hjälp av kaliumklorid och kanyl (0,9 x 38; 8), passage med hjälp av upprepad

frysning/upptining (används rutinmässigt vid odling av virus vid SVA), passage med hjälp av trypsinering och kanyl (8), och passage med hjälp av trypsinering och ultrasonisering (9). Slutsatsen av detta försök var att passage med hjälp av kaliumklorid och kanyl var den mest optimala metoden.

Under 2007 hade kontakt etablerades med doktor C. Gebhart, University of Minnesota, USA, som är den person i världen som har störst erfarenhet av odling av *Lawsonia* (10). Möjligheterna att få besöka detta lab. hade tidigare diskuterats och under hösten 2008 konkretiserades planerna.

I februari 2009 gjordes ett en vecka långt studiebesök vid University of Minnesota, för att erhålla kunskap om deras metoder för isolering av bakterien från tarm, odlingsteknik och metoder vid passage. (Samtidigt diskuterades även möjligheterna till framtida samarbetsprojekt beträffande smittspridning av bakterien mellan olika djurarter och smittspårning).

I mars 2009 framställdes nya tarmfiltrat, denna gång från två grisar med PHE (den form av sjukdomen som kliniskt ses som tarmlödnings) eftersom detta enligt C. Gebhart är det enda provmaterial som fungerar för odling.

I april påbörjades nya försök med odling. Odlingarna fungerade bra i 3 passager, därefter började McCoy-cellerna dö. En vecka senare var samtliga celler döda i de flaskor som infekterats med tarmfiltrat, medan kontrollodlingarna (vaccinstammen samt ”rena” celler) växte som förväntat. Det fanns inga tecken på bakteriell förorening. Prov skickades till SMI, Stockholm, för kontroll av virus. Resultaten visade att de cellodlingar som inokulerats med tarmfiltrat var infekterade med reovirus. Detta tyder på, att reovirus funnits i grisarnas tarmslemhinna och isolerats tillsammans med *Lawsonia* vid filtreringen. Förfrågan hos C. Gebhart konfirmerade, att virus kan vara ett problem vid isolering av bakterien.

Under hösten 2009 startades ytterligare ett odlingsförsök. Denna gång centrifugerades ett av ovanstående PHE-isolat över en densitetsgradient, en metod som tidigare utvecklats för att förbättra PCR-diagnostiken av *Lawsonia* (SLF-projekt nr 0352013; 11). Eftersom virus och bakterier har olika densitet borde de teoretiskt kunna separeras med hjälp av en sådan centrifugering. Två olika densitets-skikt användes och beräknades på så sätt att bakterierna borde hamna i det översta skiktet, och virus i det nedersta. Efter centrifugering infekterades McCoy-cellerna omedelbart genom inkubation i antibiotikafritt medium i 6 timmar, varefter mediet byttes till DMEM med tillsats av antibiotika. Odlingen passerades därefter 2 gånger per vecka med hjälp av 0,1 % kaliumklorid och kanyl. Denna gång erhöles riklig växt av bakterien och den kunde odlas i 10 passager utan någon påvisbar föroreningsflora. **Försöket betraktades därmed som lyckat och avslutades.**

**Delmål 2).** (Ej inom ramen för denna ansökan).

Under våren 2010 har experimentella infektionsförsök genomförts på gris. Odlingen har fungerat väl även om det varit logistiskt krävande att få ihop stora mängder bakterier inom en begränsad tidsrymd. Följande parametrar har undersökts: Infektion med bakterien i renkultur respektive infektion med ett homogenat av infekterad tarm, två olika infektionsdoser av bakterien i renkultur, samt betydelsen av djurens ursprung (SPF-djur kontra icke infekterade grisar från en smittad besättning). Det kliniska resultatet tyder på att både infektionsdos och djurens ursprung har betydelse för utvecklandet av sjukdom. Laboratorieanalyser har delvis påbörjats men några laboratorieresultat föreligger ännu inte, och hittillsvarande resultat visar

också att ytterligare utvecklingsarbete behövs för att på ett reproducerbart sätt kunna kvantifiera bakterien i cellodlingar.

**Delmål 3).** (Ej inom ramen för denna ansökan).

På grund av svårigheterna med att etablera en fungerande odling, har denna del ännu inte genomförts.

## DISKUSSION

På basis av den information som sedan tidigare finns publicerad beträffande odling av *Lawsonia intracellularis*, bedömdes delmål 1) kunna genomföras inom en tidsram av ett år (8-10). Dock har kontakter med R. Lindecrona och T. K. Jensen, Danmark givit vid handen, att odling av bakterien kan vara mycket besvärlig. *L. intracellularis* kan inte odlas på konventionella odlingsmedier utan enbart inuti levande celler i odling. Vid veterinærinstituttet har försök att odla bakterien pågått sedan 2001, och under våren 2009 vistades R. Guedes, Brasilien (10) där som gästforskare i ett halvår i syfte att etablera en cellodlad stam av *L. intracellularis*. Dessa försök misslyckades dock (R. Guedes, pers. medd.) och enligt senare publikationer har man etablerat odling av vaccin-stammen i Danmark men däremot hittills inte lyckats odla något "fält-isolat" (12). Utifrån erfarenheterna från denna studie och de upplysningar som erhållits från C. Gebhart och R. Guedes, verkar de största svårigheterna vara förknippade med isoleringen av bakterien från tarmen. Tarmen koloniserar av ett otal bakteriearter, varav de flesta inte ens är karakteriserade. Även om tarmen rensas och sköljs så att all synbar förorening avlägsnas, finns ett stort antal mikrober kvar som koloniserar eller binder till tarmens yta. Utöver detta finns det några bakterie- och virusarter som lever inuti tarmväggens celler, varav *L. intracellularis* är en. Bakterien är förhållandevis liten (0,25 gånger 1,25 µm) och gängse teknik baseras på filtrering genom ett filter med porer (0,65 µm) som hindrar större organismer att passera. Dessa filter hindrar dock inte virus från att passera och den information som erhållits (C. Gebhart, R. Guedes, pers. medd.) tyder på att detta kan vara ett i sammanhanget vanligt problem, trots att det inte finns beskrivet i litteraturen. I studien påvisades reovirus i cellodlingarna med hjälp av elektronmikroskopi. Virus kunde inte påvisas i de rena cellodlingarna och inte heller i odlingar av vaccinstammen. Detta tyder på, att reovirus funnits i grisarnas tarmar och isolerats samtidigt med *L. intracellularis*. Det finns inga beskrivningar i litteraturen om hur en reovirus-infektion kan påverka grisen, men i denna studie var virus 100 % letalt (dödligt) för odlade celler, varför det inte kan uteslutas att viruset kan ha potential för att orsaka sjukdom hos gris.

Enligt C. Gebhart (pers. medd.) hanteras problemet genom att använda isolat från grisar med PHE, samt att personen som genomför odlingen måste ha "fingertoppskänsla" och vara beredd att arbeta även utanför ordinarie arbetstid, om odlingen skall lyckas. Troligen innehåller isolat från grisar med PHE en stor mängd *L. intracellularis*, samtidigt som skadorna i tarmen medför att endast ett fåtal andra mikroorganismer finns kvar i cellerna. Denna form av sjukdomen är dock ovanlig i Sverige och inom ramen för en tidigare studie (SLF-projekt nr V0550035) erhöles, under en period om 3 år, endast 2 prov från grisar med PHE. Ytterligare ett prov har erhållits från avdelningen för patologi, SVA, och har utnyttjats i detta försök. I en annan, tidigare studie (SLF-projekt nr 0352013; 11), användes en ny metod för att diagnosticera *L. intracellularis* i avföringsprov. Metoden bygger på att bakterien separeras från andra mikroorganismer genom sin specifika densitet, med hjälp av centrifugering i ett kolloidalt medium med flera skikt av olika densitet. Denna metod utnyttjades för att separera *L. intracellularis* från reovirus i den här redovisade studien. Resultaten är mycket lovande och förhoppningsvis kan detta innebära att bakterien kan börja odlas i större skala än vad som tidigare varit fallet (för närvarande finns 15-16 isolat vid C.

Gebharts lab. i USA, varav ett isolat används för vaccinfremställning vid läkemedelsföretaget Boehringer Ingelheim, ett isolat finns troligen i Edinburgh men odlas inte för närvarande, och eventuellt finns ett isolat i Korea). Om fler isolat kan etableras i odling ger detta möjligheter för studier av smittspridning och smittspårning. Det kan även möjliggöra framtagandet av en genetiskt modifierad vaccinstam där en sådan stam, till skillnad från nuvarande vaccin, kan identifieras specifikt och därmed skiljas från "fältstammar" vid analys. För detta ändamål fodras dock även mer kunskap om hur kroppens immunsystem aktiveras vid infektion med *L. intracellularis*, vilket ingår i delmål 3) i denna studie.

I studien användes även tre olika metoder för att kvantifiera bakterierna i odlingen (infärgning med immunofluorescens (8); infärgning med immunohistokemi (10); och kvantitativ realtids-PCR; under utveckling). Ingen av metoderna gav ett fullgott och reproducerbart resultat, men realtids-PCR med användande av en internkontroll (mimic) för kvantifiering har utvecklats och skall utvärderas på ett större, kliniskt material under hösten. Dessa försök syftar till att utveckla en semi-kvantitativ metod för rutindiagnostik av faeces- och vävnadsprov (sparsam, måttlig resp. riklig förekomst av *L. intracellularis*) vilket kan användas för att indikera ett samband mellan påvisande av bakterien i faeces, och sjukdom.

## **PUBLIKATIONER**

Resultaten i delmål 1). är inte i sig själva tillräckliga för att generera en fullständig publikation, men då det inte finns några tidigare uppgifter i litteraturen om problemet med förorening av reovirus vid isolering av *Lawsonia* från tarm, och då användandet av densitetscentrifugering är en ny metod att lösa problemet, avser vi att publicera delstudie 1) i form av en "short communication" i en vetenskaplig tidskrift. Den ovan nämnda metoden för att kvantifiera *L. intracellularis* i odling (realtids-PCR) valideras för närvarande och kommer att publiceras i svensk veterinärtidning och i lämplig vetenskaplig tidskrift. Delstudie 1) är en förutsättning för delstudie 2) och 3), vilka kommer att generera ett antal publikationer i populär-vetenskapliga såväl som vetenskapliga tidskrifter.

## **REFERENSER**

1. **Möller K**, Jensen TK, Jorsal SE, Leser TD, Carstensen B. 1998. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet Microbiol* 62, 59-72
2. **Wills RW**. 2000. Diarrhea in growing-finishing swine. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 16, 135-61
3. **McOrist S**, Smith SH, Green LE. 1997. Estimate of direct financial losses due to porcine proliferative enteropathy. *Vet Rec* 140, 579-581
4. **Jacobson, M.**, Hård af Segerstad, C., Gunnarsson, A., Fellström, C., de Verdier Klingenberg, K., Wallgren, P., Jensen-Waern, M. 2003. Diarrhoea in the growing pig – a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Res Vet Sci* 74:2, 163-169.
5. **Jacobson, M.**, Gerth Löfstedt, M., Holmgren, N., Lundeheim, N., Fellström, C. 2005. The prevalence of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish swine herds and in the wild boar population. *J. Vet. Med. B.* 52:7, 386-391.
6. **Jacobson, M.**, Aspan, A., Heldtander Königsson, M., Hård af Segerstad, C., Wallgren, P., Fellström, C., Jensen-Waern, M., Gunnarsson, A. 2004. Diagnosis of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on different sample preparation methods for PCR. *Vet. Microb.* 102:3-4, 189-201.
- 7.

8. **Lawson G.H.K.**, McOrist S., Jasnin, S., Mackie, R. A. 1993. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: Cultivation and maintenance *in vitro*. J. Clin. Microbiol. 31: 1136-1142.
9. **Dittmar M**, Hoelzle L.E., Hoelzle K., Sydler T., Corboz L., Miserez R., Wittenbrink M.M. 2003. Diagnosis of porcine proliferative enteropathy: detection of *Lawsonia intracellularis* by pathological examinations, polymerase chain reaction and cell culture inoculation. J Vet Med B 50, 332-338
10. **Guedes, R.M.C.**, Gebhart C. J. 2003. Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. Vet. Microbiol. 93: 159-166.
11. **Jacobson, M.**, Norling, B., Gunnarsson, A., Aspan, A. 2009. Flotation -a new method to circumvent PCR inhibitors in the diagnosis of *Lawsonia intracellularis*. Int. J. Microbiol. 2009:410945. doi: 10.1155/2009/410945. E.pub 2009 Jun 17, 7 p.
12. **Boutrup, T.S.**, Schauser, K., Agerholm, J. S., Jensen, T. K. 2010. Application of a pig ligated intestinal loop model for early *Lawsonia intracellularis* infection. Acta Vet. Scand, 52:17, <http://www.actavetscand.com/content/52/1/17>.