

Slutrapport

Epidemiologi och betydelse av infektion med fowl adenovirus (FAdV) för kycklingnäringen i Sverige

Projektnummer: O-15-20-324

Projektperiod: 2015-05-01 – 2017-12-31

Huvudsökande:

Désirée S. Jansson, Avd. för djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA,
desiree.jansson@sva.se

Medsökande:

Siamak Zohari, Avd. för Mikrobiologi, SVA
Helena Eriksson, Avd. för Djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA
Ann Nyman, Växa Sverige (tidigare anställd vid SVA)
Pia Gustafsson, Svensk Fågel
Eva Berndtson, Scandi Standard
Anna Birgersson, Blenta AB

Doktorand: Ylva Lindgren, Avd. för Djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA

Del 1: Utförlig sammanfattning

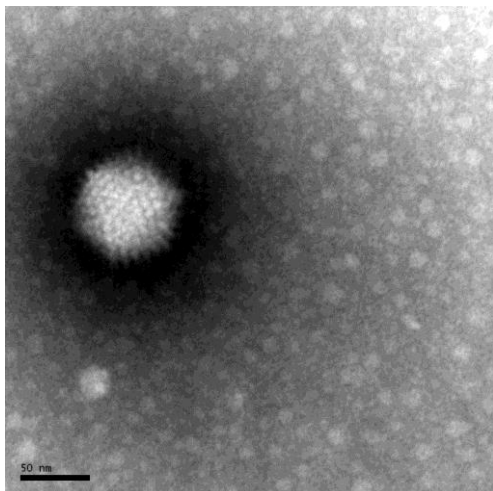
Fowl adenoviruses (FAdVs) infect chickens and are the aetiological agents of the globally emerging disease inclusion body hepatitis (IBH), and less often hydropericardium syndrome and gizzard erosion in broilers. In this project we investigated the epidemiology of FAdV among meat-type breeder birds and broilers and characterized viruses by serology, PCR and molecular techniques. One specific aim was to determine which species of FAdV predominate in Sweden in order to enable future vaccination. Our results suggested that FAdV is far more widespread than previously known. Breeder flocks regularly seroconverted before onset of lay, and vertical transmission of FAdV could not be detected during the early and mid-production stages. This suggests that vertical transmission may be less important than previously known, but it may still play an important role. FAdV was detected in a large majority of broiler flocks, regardless of clinical status. A high level of genetic diversity was found among analysed FAdVs from breeders and broilers, but species D and E (serotypes 2 and 8) predominated in both bird categories. These species have been associated with IBH outbreaks. Species A, B and C, were less commonly detected. During this project a cluster of outbreaks or gizzard erosion was diagnosed in broiler flocks in association with FAdV-A for the first time in Sweden. The source of these outbreaks could not be identified, but vertical transmission was suspected because FAdV may be occasionally found in breeder flocks. Based on our results we suggest that improved biosecurity and cleaning and disinfection of barns between flocks may help to reduce the spread of FAdVs. The importance of vertical spreads need to be further researched. Future vaccines should target FAdV-D and E of serotypes 2 and 8.

Projekt har fått finansiering genom:

Del 2: Rapporten

Inledning

Adenovirus hos tamhöns (fowl adenovirus, FAdV) (Figur 1) klassificeras inom släktet *Aviadenovirus*, familj *Adenoviridae*. FAdV indelas i fem arter/12 serotyper (Tabell 1).



Art	Serotyp
FAdV-A	1
FAdV-B	5
FAdV-C	3, 4, 10
FAdV-D	2, 9, 11
FAdV-E	6, 7, 8a, 8b

Tabell 1. Klassificering av FAdV enligt International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV, <http://www.ictvonline.org>.

Figur 1. Elektronmikroskopisk bild av FAdV-A isolerat inom projektet.

Infektion med FAdV hos tamhöns kan orsaka sjukdomarna inklusionskroppshepatit (IBH) [[SVA:s webbsida](#)], hydroperikardsyndrom och muskelmagserosion. IBH är den vanligaste sjukdomen och är framförallt kopplad till arterna FAdV-D och E. Korsimmuniteten är starkt begränsad, vilket innebär att tamhöns kan infekteras upprepade gånger av olika arter och serotyper av FAdV och val av vaccin försvåras.

IBH har rapporterats från framförallt Europa, Australien och Nordamerika men utbrott ses i många länder. Utbrott har förekommit sporadiskt i Sverige sedan 1990-talet och antalet utbrott har ökat avsevärt de senaste åren. Diagnosen ställs genom obduktion och mikroskopi eventuellt i kombination med PCR-teknik för att påvisa FAdV.

Utbrott av IBH karaktäriseras av plötsligt ökad dödlighet (2–10 (30 %)) under ca fem dagar med ospecifika symtom: nedsatt allmäntillstånd, inaktivitet, uppruggad fjäderdräkt och hukande kroppsställning, bland ca 2–7 veckor gamla kycklingar. Förhöjd foderkvot och sänkt tillväxt är också vanligt men omfattningen är oklar. FAdV sprids såväl horisontellt (mellan fåglarna) som vertikalt (från hönan via ägget till avkomman, men indirekt spridning via människor och utrustning kan också bidra till spridningen. Epidemiologin i fältbesättningar är bristfälligt känd.

Projektet syfte och mål

Det övergripande syftet med projektet var att vinna ökad kunskap om epidemiologin, virusegenskaper och betydelsen av FAdV-infektion i kommersiell kycklinguppfödning (matfågel) i Sverige. Följande tre delprojekt ingick:

1. Kartläggning av FAdV-förekomst och omfattning och duration av vertikal smittspridning från föräldradjur (parentsgenerationen) till kycklingar.
2. Kartläggning av FAdV-förekomst hos kycklingar med misstänkt IBH och hos friska kycklingar, samt utredning av betydelsen av IBH för produktion och ekonomi.

3. Karaktärisering av FAdV från parentshöns och kycklingar för att identifiera dominerande genetiska varianter, arter och serotyper för att möjliggöra framtida vaccination samt utreda evolutionära aspekter.

Material och metoder

Serologi och provtagning av ägg och fåglar

Infektion med FAdV påvisades hos avelshöns i delprojekt 1 och 2 genom serologi dvs antikroppsdetektion i blodprov med en kommersiell ELISA-test (Group 1 Avian Adenovirus Antibody Detection Kit, Biocheck, påvisar antikroppar mot samtliga serotyper). För att undvika extra provtagning av avelshönsen sökte och erhöll vi tillstånd av Jordbruksverket att använda befintliga prover från ett kontrollprogram ([Hönshälsokontrollprogrammet](#)) genom vilket hönorna provtas rutinmässigt var 12:e vecka från 16 veckors ålder.

Från samma avelsflockar samlades okläckta ägg (kläckeriavfall) med hjälp av kläckeriernas personal när föräldraflockarna uppnått 30 respektive 40 veckors ålder (delprojekt 1). Proverna representerade föräldrarnas virologiska status 3–4 veckor tidigare, dvs vid tidig kläckäggproduktionsfas och i mitten av produktionsperioden. Proverna undersöktes med PCR-teknik, se nedan. Syftet var att påvisa vertikal smitta.

I delprojekt 1 och 2 utfördes provtagning av organ från avelshöns och kycklingar för att påvisa FAdV-infektion med PCR-teknik. I båda delprojekten provtogs lever (målorgan för FAdV) samt blindtarmstonsiller dvs lymfoid vävnad i blindtarmen där virus ofta kan påvisas under en längre tid än i levern. Fåglarna som provtogs var i samtliga fall självdöda eller hade avlivats på gårdarna pga sjukdom eller skada. Inga fåglar avlivades med syfte att ingå i forskningsprojektet.

Molekylär detektion av FAdV (delprojekt 1–3) och fylogenetisk analys (delprojekt 3)

PCR-teknik är känslig och specifik och har på senare år blivit en allt viktigare metod för påvisande av virus som alternativ till isolering. I projektet påvisade vi arvs massa från FAdV med en PCR riktad mot L1-loopregionen hos hexongen (Meulemans *et al.*, 2001). Metoden att påvisa vertikal överföring genom provtagning av ägg och PCR-analys testades genom en pilotstudie före projektstart. Resultaten från pilotstudien visade att FAdV fanns i majoriteten av de undersökta okläckta avelsäggen från en avelsflock (Jansson *et al.*, opublicerade resultat). Sekvensering av hexongen utfördes baserat på PCR-produkten.

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 ett så kallade dendrogram, släktskapsträd, och på så sätt avgöra genetisk likhet och släktskap mellan olika gener och virusstammar. I projektet användes sekvensdata från hexongen och trädkonstruktionsalgoritmen ”maximum likelihood” i programmet MEGA 7.2. Fylogenei baserat på helgenom ingår också i projektet.

Serotypning av FAdV (delprojekt 3)

Serotypning har av branschen bedömts som synnerligen angeläget att utföra eftersom kännedom om vilka serotyper som förekommer är en nödvändig förutsättning inför utveckling/val av vaccin. Serotypning utfördes tidigare genom neutralisationstest, vilket är tidskrävande och förutsätter att man har tillgång till virusisolat och en komplett panel av antikroppar mot kända serotyper. Allt färre laboratorier utför idag denna analys. I

projektet utfördes serotypning med PCR-teknik och sekvensering av genen för enzymet DNA-beroende DNA polymeras enligt Kaján *et al.* (2011) i samarbete med ungerska forskare (Dr. V Palya, CEVA-PHYLAXIA ZRT, Budapest).

Virusiolering: Virusisolering gjordes i cellkultur (chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH, ATCC) och i specifikt patogenfria (SPF) ägg genom ympning via allantois och äggulan.

Next generation sequencing (NGS)

NGS är en ny DNA-sekvenseringsteknik som snabbt revolutionerat hur forskning om de genetiska egenskaperna hos ett virus kan utföras. Tekniken är mycket effektiv och kan snabbt producera stora mängder sekvensdata till en relativt låg kostnad. Metoden som används vid SVA:s Avdelning för Mikrobiologi är baserad på Illuminas NGS-plattform och ett sk metagenomikprotokoll som kartlägger all DNA i provet. Den experimentella delen av NGS-metoden kan delas upp i två steg, i) preparering av ett sk DNA-provbibliotek för varje prov och ii) sekvensering. I prepareringen av ett DNA-provbibliotek anrikas först DNA via en hybridiseringsprocess. Denna anrikning utförs separat för de två olika DNA-strängarna. Därefter kopplas specifika oligonukleotidadapter på varje fragment för att möjliggöra sekvensering.

Analys av NGS-data

NGS-tekniken genererar en massiv sekvensmängd för varje prov. För att identifiera den virusarvsmassa som man är intresserad av sker ett antal dataanalyssteg i samband med sekvensering. Först används den publika sekvensdatabasen GenBank ([Länk till GenBank](#)) där all producerad sekvensdata från instrumentet jämförs mot all befintlig sekvensdata i GenBank. Jämförelsen utförs med hjälp av en bioinformatisk algoritm som kallas BLAST (eng. Basic Local Alignment Search Tool). Därefter kan sekvensdata från MiSeq-instrumentet matchas mot ett referensgenom för att definiera vilka sekvenser som hör till ett visst virus. Genererade sekvensdata kan även användas till att identifiera basparspositioner där den undersökta sekvensen inte matchar referensgenomet, sk varianter (potentiella mutationer). Variantfrekvensen ger en indirekt uppfattning av hur frekvent mutationen är hos den undersökta virusstammen. I denna analys utnyttjas det faktum att varje prov representeras av två olika provbibliotek. Endast varianter som korrekt återfinns i båda provbiblioteken används för vidare analys. Detta tillvägagångssätt har fördelen av att kunna identifiera och filtrera bort basparsvariationer som tillkommit genom hanteringsprocessen. Alla dessa steg är inbyggda i ett strömlinjeformat analysflöde som utförs automatiskt på MiSeq-instrumentet under och via analys i CLC Genomic Workbench efter att sekvenseringen är klar. Resultatet av analysen består av en elektronisk fil med sekvenser.

Statistisk analys (delprojekt 2)

Statistisk analys I delprojekt 2 utförs med univariat och multivariat regressionsmodell samt deskriptiv statistik med t-test, chi²-test och Fisher's Exact test.

Resultat och diskussion

Delprojekt 1

I delprojekt 1 analyserades totalt 1900 blodprover från samtliga avelsflockar (matfågel) i Sverige under perioden maj 2015 – juni 2016. Proverna representerade två hybrider (Cobb och Ross) och två avelsföretag. Antalet undersökta flockar var 87 vid 16 veckors

ålder och 52 vid 24 respektive 36 veckors ålder. Antalet flockar var högre före produktionsstart (16 v) eftersom vissa flockar slås samman inför produktionsstart.

Analyserna visade att majoriteten av flockarna (80/87, 92 %) hade serokonverterat vid 16 veckors ålder. I 34/80 (42 %) seropositiva flockar var samtliga 10 prover positiva. Det ena företaget hade bara enstaka flockar där samtliga prover var positiva, vilket tyder på att flockarna kan ha smittats något senare än hos det andra företaget som hade hög andel flockar med hög seroprevalens (alla prover positiva). Vid 24 veckors ålder var 50/52 flockar seropositiva (96 %) och vid 36 veckors ålder hade samtliga 52 flockar serokonverterat och i drygt 90 % av flockarna var samtliga 10 prover positiva. Beslut fattades därför att utesluta den planerade analysen vid 48 veckors ålder.

Insamling av ägg (kläckeriavfall) gjordes på tre kläckerier (två företag) från september 2015 i takt med att de provtagna flockarna ovan började producera kläckägg, och pågick till juni, 2016. Relativt tidigt under projektets gång fattades beslut att öka antalet analyserade ägg per provtagningstillfälle och flock från 10 till 20 ägg för att öka möjligheten att påvisa virus. Antalet provtagna flockar minskades därigenom från 52 till 35. Totalt provtogs (lever och blindtarmstonsiller) och analyserades 949 ägg. Samtliga prover analyserades med PCR för påvisande av hexongen. Virus påvisades ej.

Med syfte att konfirmera resultaten och fördjupa kunskapen utfördes två kompletterande tidigare ej planerade studier.

Kompletterande delstudie 1.1: Utökad provtagning för konfirmering av resultaten

Fyra individuella avelsflockar (båda avelsföretagen deltog) valdes slumpmässigt för provtagning vid 24–26 veckors ålder. Ingen av flockarna hade deltagit i den tidigare undersökningen. Totalt 62 självdöda eller avlivade avelshöns (15–17/flock) ingick. Lever och blindtarm provtogs och analyserades med PCR. Parallellt analyserades 80 okläckta ägg insamlade när flockarna var 30 veckor gamla, det vill säga motsvarande 26–27 veckors ålder hos avelshönsen. Serologisk analys av sparade serumprover vid 16 (4/4 flockar) respektive 24 veckors ålder (3/4 flockar) utfördes också.

Resultaten bekräftade tidigare fynd. Flockarna hade serokonverterat vid 16 och 24 veckors ålder och andelen höns med antikroppar var hög (70–100 %). Samtliga prover från höns och ägg var negativa avseende FAdV.

Kompletterande delstudie 1.2 Kartläggning av virusförekomst i parentsflockar under uppfödningperioden

En andra tidigare ej planerad studie genomfördes för att konfirmera att hönorna infekterades av FAdV före produktionsstart. Sex parentsflockar (båda avelsföretagen deltog) valdes slumpmässigt ut för provtagning. De hade tidigare ej deltagit i projektet. Prov insamlades från en kyckling per dag från 1–112 dagars ålder. Proverna analyserades med PCR-teknik och artbestämning skedde genom sekvensering (hexongen). Sparade serumprover från fyra av flockarna (16 veckors ålder) analyserades serologiskt avseende FAdV. Resultaten visas i Tabell 2.

Tabell 2.

Flock nr/avelsföretag	FAdV påvisat vid ålder (v)	FAdV-art
1/A	6, 7, 8	D
2/A	Neg	

3/B	11	D
	16	A
4/B	12	D
5/B	14	A
	15	A och D
	16	D
6/B	Neg (seropositiv flock)	

Virus kunde isoleras från fåglar infekterade av FAdV-A, D och E.

Ej genomfört

I delprojekt 1 ingick även en planerad jämförelse mellan FAdV-infekterade och oinfekterade avelsflockar avseende produktionsresultat (äggproduktion, kläckprocent, dödlighet hos avelsdjuren). Denna del av projektet kunde inte genomföras eftersom i stort sett samtliga flockar infekterades redan under uppfödningensperioden.

Diskussion

Resultaten från delstudie 1 visade att FAdV under den aktuella perioden infekterade samtliga svenska avelsflockar (matfågel) i tidig ålder, ofta redan under uppfödningensperioden, vilket ger upphov till immunitet och ej påvisbar vertikal smittöverföring under första delen av produktionsperioden. Detta talar för att vertikal smitta inte ensamt kan förklara IBH-utbrotten i svenska kycklingflockar. Även om vertikal smittspridning inte kunde påvisas i denna studie är det känt att det förekommer och tidigare påvisat även i Sverige. Vertikal smitta är sannolikt ett resultat av reinfektion av föräldradjuren när deras immunitet med tiden minskat eller när de exponeras för nya arter/serotyper som de tidigare inte träffat på. I 2/6 flockar i den kompletterande studien 1.2 påvisades två olika arter av FAdV under uppfödningensperioden, som koinfektion eller seriellt. Att detta kan förekomma är känt sedan tidigare, men våra resultat tyder på att koinfektion med flera FAdV-arter är vanligare än vad som tidigare varit känt.

Möjliga smittkällor för parentshönsen är vertikal smitta från importerade grandparents kycklingar och/eller miljösmitta i form av en yttre viruskälla eller residualsmita i djurutrymmen från tidigare flockar. Smittkällan för avelshönsen undersöktes ej inom ramen för vårt projekt.

Delprojekt 2

Kartläggning av förekomst av FAdV bland kycklingar med misstänkt IBH

Från november 2015 till sensvåren 2017 genomfördes en aktiv insamling av prover från misstänkt IBH-drabbade kycklingflockar. Insamlingen gjordes via ett upprop bland kliniskt aktiva fjäderfäveterinärer. Materialet kompletterades med några fall som inkom före/under projektperioden inom ramen för SVA:s rutindiagnostiska verksamhet. Resultaten av insamling och analyser redovisas i Tabell 3.

Tabell 3. Sammanfattning av resultat från flockar inkomna MED misstanke om IBH

Insamlingsperiod	Antal flockar	PCR-resultat (hexongen),	Påvisad FAdV-art genom sekvensering (art/antal flockar)	IBH konfirmerad (mikroskopi)
------------------	---------------	--------------------------	---	------------------------------

		antal positiva flockar		(antal flockar)
Jan-sept, 2015 (före projektstart)	6	6	D (6/6)	5/6
Nov 2015–juni 2017	38	31	D (26/31) E (3/31) D + E (2/31)	19/26 0/3 0/2 0/7 PCR-neg*
TOTALT	44	37	-	24

Bland de FAdV-infekterade flockarna tillhörde samtliga utom två samma hybrid. Fem uppdrag uteslöts eftersom ofixerat organmaterial för PCR-analys saknades.

Kartläggning av förekomst av FAdV bland friska kycklingar

Provtagning har utförts under perioden maj 2017 – januari 2018 i kycklingflockar utan sjukdomssymtom för att kartlägga förekomsten av FAdV i en frisk population. Urvalet var slumpmässigt och baserades på kläckeriernas leveransdata. Tio kycklingar provtogs vid 26–28 dagars ålder i varje flock. Två hybrider och två avelsföretag var representerade. Totalt inbjöds 37 producenter att delta varav 35 tackade ja. Av de 30 provtagna flockarna påvisades FAdV i 23 (77 %). I majoriteten av flockarna påvisades FAdV-D eller E och i ett mindre antal flockar påvisades både FAdV-D och E.

Oavslutad studie: I delprojekt 2 ingick en epidemiologisk/statistisk analys för att kartlägga effekter av IBH-utbrott avseende produktion och ekonomi Efter att virusanalyserna var avslutade gjordes ett urval av analysparametrar (ex total dödlighet, foderkvot, kassation vid slakt, tillväxt) i samråd med branschorganisationen Svensk Fågel från branschens uppföljningsprogram TUPPEN. Data från flockar med (Tabell 3) och utan IBH samlades levererades i maj 2018 och statistisk analys har därför ej kunnat slutföras inför slutrapporteringen. Detta kommer att göras inom ramen för ett pågående doktorandprojekt.

Kompletterande delstudie 2.1: Uppföljning av FAdV-förekomst hos föräldradjur till kycklingar med IBH

Eftersom antalet påvisade virus i delstudie 1 var färre än förväntat gjordes ytterligare ett försök att påvisa virus hos föräldradjuren, denna gång i avelsflockar som var föräldrar till kliniskt sjuka kycklingflockar (Tabell 3). Prover (lever och blindtarmstonsiller) samlades från totalt 73 självdöda eller avlivade parentshöns från 11 flockar under perioden mars – juni 2016. Urvalet baserades på att de var föräldrar till flera av de PCR-positiva slaktkycklingflockarna. Åldern vid provtagning varierade mellan flockarna och likaså tiden som förlöpt sedan IBH diagnostiserats hos kycklingarna.

Resultaten visade följande: FAdV påvisades ej med PCR-teknik bland de provtagna avelshönsen i 9/11 flockar. En avelsflock var positiv avseende FAdV-A. Denna flock var förälder till tre kycklingflockar som var positiva avseende FAdV med PCR-analys, men utan konfirmerad mikroskopisk IBH-diagnos. Föräldraflocken i detta fall hade ingått även i delprojekt 1, men virus hade då inte påvisats i kläckäggen vid provtagning vid 30 respektive 40 veckors ålder. Hönorna i den andra positiva avelsflocken var mammor till sex kycklingflockar med konstaterad IBH och i vilka FAdV-D hade

påvisats. Tyvärr har vi inte kunnat fastställa vilken art det rörde sig om hos föräldradjuret. Virusisolering misslyckades från de båda infekterade föräldraflockarna.

Kompletterande delstudie 2.2 Utbrott av FAdV-associerad muskelmagsdegeneration bland kycklingar våren 2016

I samband med rutinobduktioner utförda på SVA diagnostiserades muskelmagserosion i fyra kycklingflockar hos olika uppfödare i april–maj 2016. Symtomen bestod av nedsatt och ojämn tillväxt samt nedsatt/upphörd aptit i kombination med hög gallring. Ytterligare ett utbrott konstaterades i en av besättningarna senare samma år. I samband med utredningen påvisades inklusionskroppar i epitelceller i muskelmagen (2/4 flockar) och FAdV-A påvisades med PCR-teknik och sekvensering i organprover. I samarbete med Prof. Hess, University of Veterinary Medicine (VetmedUni), Wien, Österrike konfirmerades diagnosen i samtliga fyra flockar genom *in situ*-hybridisering (virus påvisas med DNA-prover i vävnaden i direkt anslutning till vävnadsskador). På en av gårdarna provtogs även en frisk kontrollflock i vilken FAdV-E påvisades. Utredning och provtagning utfördes i 11 av 14 föräldraflockar till de drabbade kycklingarna. I samtliga 11 flockar var 10/10 prover serologiskt positiva avseende FAdV vid analystillfället närmast i tid före utbrottet hos kycklingarna. Försök gjordes även att påvisa virus i ägg från föräldrarna med PCR, men med negativt resultat.

Diskussion: En majoritet av kycklingflockarna var infekterade med FAdV, oavsett klinisk status, vilket var ett oväntat resultat. Resultaten stöds dock av en tidigare studie från Kanada som rapporterade att ca 40 % av flockarna var infekterade med potentiellt sjukdomsframkallande varianter av FAdV vid slakt (Eregae *et al.*, 2014). Länge betraktades FAdV som ett opportunistiskt virus som orsakar sjukdom (IBH) hos immunsupprimerade kycklingar. Senare studier har visat att FAdV är primärt patogent (Gomis *et al.*, 2006; Hess, 2013). Det kan finnas flera orsaker till våra resultat. En möjlighet är att IBH är underdiagnostiserat i Sverige. Det kan inte uteslutas att lindriga utbrott undgår diagnostik, men det är mindre sannolikt att allvarliga utbrott inte upptäcks av uppfödaren. En annan möjlighet är att vissa FAdV-stammar som cirkulerar i kycklingbesättningar i Sverige är icke- eller låggradigt sjukdomsframkallande. Det är visat att sådana virusstammar kan förekomma (Hess, 2013) men omfattningen är oklar. En tredje möjlighet är att det krävs samverkande faktorer, t ex genetiska eller miljörelaterade orsaker, eller andra infektioner. Tidigare forskning har visat att matfågelhybrider är känsligare än värphönskycklingar för IBH (Matos *et al.*, 2016) men kunskap om variation mellan hybrider saknas. En annan intressant observation var att FAdV var vanligt förekommande bland friska kycklingar oavsett hybrid, men majoriteten av IBH-utbrotten under projektperioden drabbade den ena hybriden. Skillnader i rapportering skulle kunna vara en förklaring. Skillnader i känslighet mellan hybriderna eller spridning av olika FAdV-stammar med olika sjukdomsframkallande virus i de två populationerna kan heller inte uteslutas.

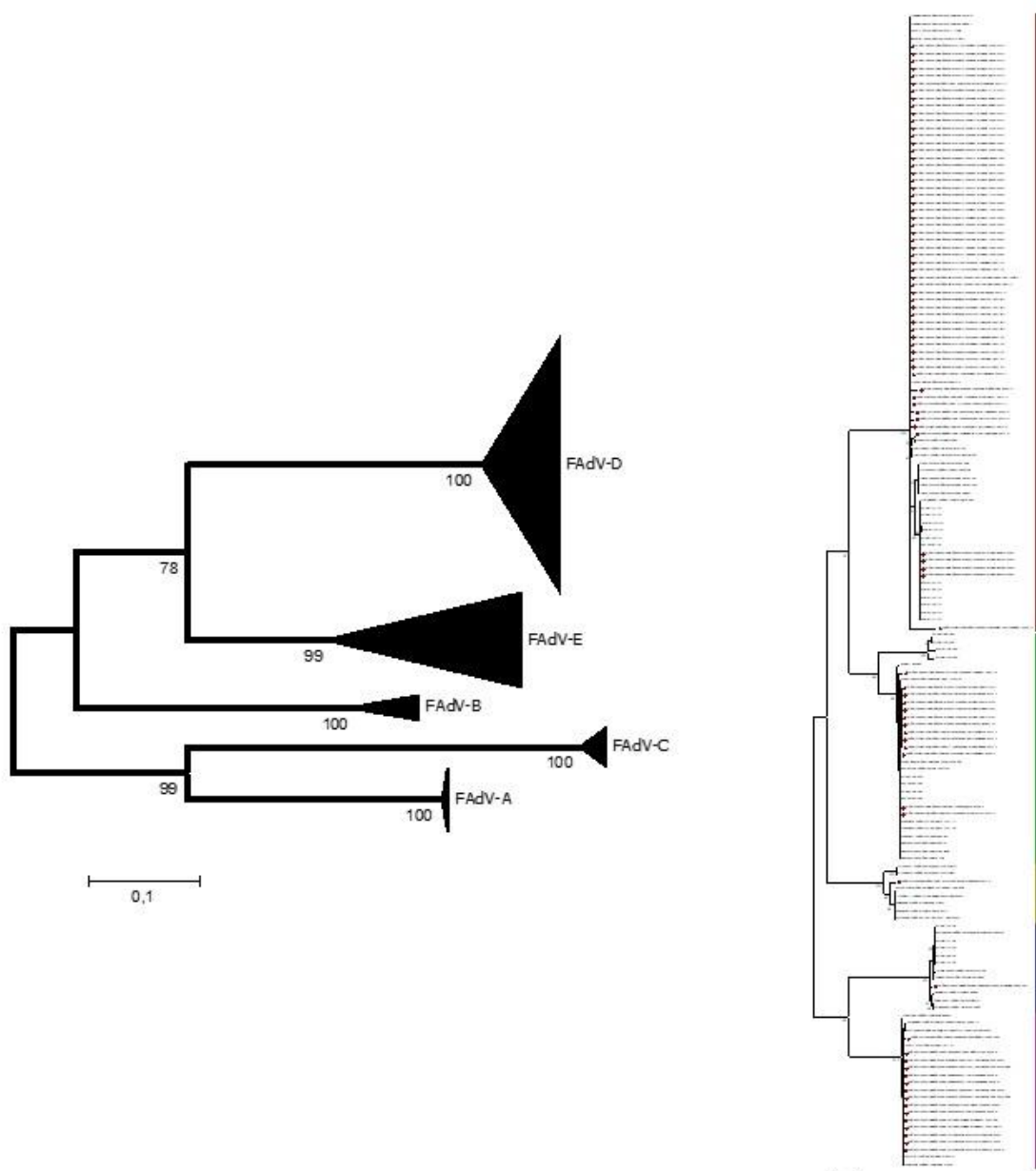
Under projektets gång inträffade utbrott av muskelmagserosion kopplat till FAdV-A. Vid tiden för utbrotten hade denna sjukdom endast rapporterats från enstaka länder, t ex Japan. Utbrotten inträffade i form av ett kluster med fall under en kort period hos olika uppfödare. Vi lyckades inte spåra källan till utbrotten, men vertikal smittspridning kan misstänkas. Från delprojekt 1 vet vi att FAdV-A förekommer i föräldraflockar i Sverige.

Delprojekt 3

Arter: Som redovisats ovan under delprojekt 1 och 2 samt i Tabell 4 har samtliga FAdV-arter påvisats inom projektet, men art D och E dominerade starkt, följt av A. Endast enstaka fall med art B och C har påvisats (tabell 4).

Fylogeni

Den fylogenetiska analysen baserat på hexongensekvenser från FAdV med prover från Sverige samt referensstammar visade en omfattande genetisk variation bland de virus som finns hos kycklingar i Sverige (Figur 2). Resultaten redovisas inte i detalj pga platsbrist i denna slutrapport. NGS-data från projektet kommer att analyseras fylogenetiskt inom ett pågående doktorandprojekt.



Figur 2. Prover från Sverige visas med symbolen (•).

Serotypning och virusisolering

Serotypning utfördes på urvalda prover från 20 flockar. Valet baserades på följande kriterier: 1) deltagande i delprojekt 2, 2) sekvenserna för hexongenens representerade olika kluster i den fylogenetiska analysen, se ovan. Se Tabell 4. Drygt 20-talet isolat finns tillvaratagna inom projektet för framtida forskning.

Tabell 4.

Kategori	Klinisk status	Antal flockar	FAdV, art	Serotyp
Kyckling (delprojekt 2)	Sjuk, IBH+	8	D	2 (8/8 flockar)
Kyckling (delprojekt 2)	Frisk	3	D	2 (2/3 flockar)*
Kyckling (delprojekt 2)	Sjuk, IBH-	2	E	8 (2/2 flockar)
Kyckling (delprojekt 2)	Frisk	3	E	8 (2/3 flockar) [§]
Unghöns (värphybrid)	Sjuk	1	D	2 (1/1 flock)
		1	E	NA [#]
Avelsflock (delprojekt 1)	Frisk	1	A	NA [#]
		1	B?	NA [#]

*En flock negativ med PCR, FAdV har isolerats; [§]En flock negativ med PCR, virus har ej isolerats;

[#]Negativ med PCR, virus har ej isolerats.

Diskussion

Delprojekt 3 bekräftade tidigare preliminära resultat (Otman *et al.*, 2015) som visat att art D och E med serotyperna 2 och 8 är de dominerande FAdV som orsakar utbrott av IBH hos kycklingar i Sverige. Denna kunskap ger ett underlag för val av vaccin. Helt nyligen publicerades studier som visade mycket god effekt av vaccination av avelshöns mot IBH hos avkomman med levande bivalent vaccin liksom avdödat subenhetsvaccin (Gupta *et al.*, 2018; Popowich *et al.*, 2018). Samtidigt har den fylogenetiska analysen visat en stor variation mellan FAdV som finns i Sverige (Figur 2).

Slutsatser

Projektet har bidragit till ny viktig kunskap om epidemiologin för FAdV-infektioner. Utbredningen av FAdV i var avsevärt högre än förväntat. Mycket talar för att yttre smittkällor och residualsmitta bidrar till virusspridning i kycklingbesättningar och att vertikal smittspridning förekommer men inte kan förklara alla IBH-utbrott. Vi har vidare visat att två arter/serotyper dominerade i kycklingflockar som drabbas av IBH men även bland friska kycklingar. Samtidigt kvarstår frågor om sjukdomssamband och genetiska varianter. Under projektets gång diagnostiserades en för Sverige ny sjukdom, FAdV-A-orsakad muskelmagerosion.

Nytta för näringen och rekommendationer

- Projektet har givit en delvis helt ny bild över förekomsten av FAdV i kommersiell kycklingproduktion i Sverige. FAdV är vida spritt i avelsledet och i kycklingflockar, även bland friska kycklingar. Idag vet vi däremot inte varför vissa flockar insjuknar medan andra förblir friska trots att virus finns i flocken.
- Smittspridningen av FAdV är komplicerad och kan ske på flera olika sätt. Vertikal smitta från avelsdjuren sker sannolikt inte lika ofta som vi tidigare har trott, men den bidrar antagligen till den stora utbredningen av FAdV. Risken för vertikal smitta via

ägg ökar sannolikt om kycklingarna i en flock kommer från många olika föräldraflockar.

- Andra smittvägar inom och mellan gårdar, indirekt smitta via utrustning och transporter och smitta som finns kvar i uppfödningshusen mellan olika flockar bidrar sannolikt till spridning av FAdV. Idag är det dock svårt att avgöra vilken/vilka av dessa smittvägar som är viktigast för FAdV. Fungerande smittskyddsrutiner och effektiv rengöring/desinfektion mellan flockarna kan sannolikt bidra till minskad spridning av FAdV.
- Tack vare projektet finns nu goda förutsättningar för utveckling av vaccin eller val av vaccin när sådana blir kommersiellt tillgängliga i Europa.

Referenser

- Eregae ME, Dewey CE, McEwen SA, Ouckama R, Ojikié D, Guerin MT. (2014). Flock prevalence of exposure to avian adeno-associated virus, chicken anemia virus, fowl adenovirus, and infectious bursal disease virus among Ontario broiler chicken flocks. *Avian Dis* 58, 71–77.
- Gomis S, Goodhope AR, Ojkic AD, Willson P. (2006). Inclusion body hepatitis as a primary disease in broilers in Saskatchewan, Canada. *Avian Dis* 50, 550–555.
- Gupta A, Popowich S, Ojkic D, Kurukulasuriya S, Chow-Lockerbie B, Gunawardana T, Goonewardene K, Karunaratna R, Ayalew LE, Ahmed KA, Tikoo SK, Willson P, Gomis S. (2018). Inactivated and live bivalent fowl adenovirus (FAdV8b + FAdV11) breeder vaccines provide broad-spectrum protection in chicks against inclusion body hepatitis (IBH). *Vaccine* 36, 744–750.
- Hess M. Ch 9. Aviadenovirus infections. (2013). In: *Diseases of Poultry* 13th Ed. Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V. Wiley Blackwell, pp. 290–300.
- Kaján GL, Sameti S, Benkö M. (2011). Partial sequence of the DNA-dependent DNA polymerase gene of fowl adenoviruses: a reference panel for a general diagnostic PCR in poultry. *Acta Vet Hung* 59, 279–285.
- Matos M, Grafl B, Liebhart D, Hess M. (2016). The outcome of experimentally induced inclusion body hepatitis (IBH) by fowl aviadenoviruses (FAdVs) is crucially influenced by the genetic background of the host. *Vet Res* 47:69.
- Meulemans G, Boschmans M, van den Berg TP, Decaesstecker, M. (2001). Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Path* 30, 655–660.
- Otman F, Shahi F, Abdel Fattah M, Renström L, Jansson DS, Zohari S. Isolation and genotyping of inclusion body hepatitis virus circulating in Swedish broiler population 2012–2014. *XIX Congress of the World Veterinary Poultry Association (WVPA)*, 7–11 September, Cape Town, South Africa, 2015.
- Popowich S, Gupta A, Chow-Lockerbie B, Ayalew L, Ambrose N, Ojkic D, Gunawardana T, Kurukulasuriya S, Willson P, Tikoo SK, Gomis S. (2018). Broad spectrum protection of broiler chickens against inclusion body hepatitis by immunizing their broiler breeder parents with a bivalent live fowl adenovirus vaccine. *Res Vet Sci*. 118, 262–269.

Del 3: Resultatförmedling

Vetenskapliga publiceringar	<p>1. Lindgren Y, Banhashem F, Eriksson H, Olofson A-S, Berg M, Zohari S, Jansson D. Gizzard erosions in broiler chickens in Sweden 2016 caused by Fowl adenovirus, species A (FAdV-A). WVPA 2017-220. <i>Congress of the World Veterinary Poultry Association XX (WVPA)</i>, Edinburgh, Skottland, UK, 4–8/9, 2017</p>
	<p>2. Lindgren Y, Banhashem F, Eriksson H, Olofson A-S, Berg M, Zohari S, Jansson D. Gizzard erosions in broiler chickens in Sweden 2016 caused by Fowl adenovirus, species A (FAdV-A). <i>Veterinärkongressen</i>, Uppsala, 9–10/11, 2017</p>
	<p>3. Lindgren Y, Banhashem F, Persson M, Eriksson H, Olofsson A-S, Blomström A-L, Berg M, Zohari S, Jansson DS. Transmission of fowl adenoviruses (FAdV) to broiler chickens in Sweden: horizontal spread predominates. <i>European Society for Veterinary Virology (ESVV)</i>, Wien, Österrike, 27–30/8, 2018 (accepterad)</p>
	<p>Planerad: Lindgren Y, <i>et al.</i> Inclusion body hepatitis (IBH) in meat producing chickens in Sweden and Finland 2012-2014. Descriptive and comparative study. (granskad artikel i vetenskaplig tidskrift)</p>
	<p>Planerad: Lindgren <i>et al.</i> Gizzard erosions in broiler chickens in Sweden 2016 caused by Fowl adenoviruses (FAdV): pathology, epidemiology and effect on production parameters <i>Avian Pathology</i> (pågående arbete)</p>
	<p>Planerad: Lindgren <i>et al.</i> Fowl Adenoviruses in meat-producing chickens in Sweden 2015–2016: pathology, epidemiology and effects on production parameters. (granskad artikel i vetenskaplig tidskrift)</p>
Övriga publiceringar	<p>Jansson D. Nytt forskningsprojekt om virussjukdom hos kyckling. Faktaruta om IBH och FAdV. <i>Fjäderfä</i> 5, 12, 2015. (Information för kycklingproducenter om projektet.)</p>
	<p>Information om sjukdomen inklusionskroppshepatit (inclusion body hepatitis/inklusionskroppshepatit, IBH) som orsakas av adenovirus (FAdV) har publicerats på SVA:s webbsida [Länk till webbsida om FAdV och IBH] (Innehåller bland annat aktuell statistik över konstaterade IBH-utbrott.)</p>

	Kommande , hösten 2018: 1–2 artiklar i Fjäderfä om projektet (resultatredovisning för kycklingproducenter och andra målgrupper). Jansson DS.
Muntlig kommunikation	151119: Presentation vid Svensk Fågels branschmöte i Jönköping: IBH (Adenovirus) (Ylva Lindgren) (presentation av forskningsprojektet)
	161004: Projektrådsmöte fjäderfä, Uppsala, Arrangör SVA (möte med nyckelpersoner i fjäderfänäringen): Forskningsprojekt: Adenovirus hos slaktkyckling, Ylva Lindgren.
	170329: Offentligt startseminarium för doktorandprojekt Ylva Lindgren: Fowl adenovirus infections in meat producing chickens in Sweden.
	170908 & 170830: Två internationella kongressrapporter med muntlig presentation, se under Vetenskaplig publicering ovan (nr 1 och 3).
	171109: Nordic Poultry Meeting, Malmö, Fowl adenovirus infections in meat producing chickens in Sweden, Ylva Lindgren
	Kommande, 181004: Projektrådsmöte fjäderfä, Uppsala, Arrangör SVA (möte med nyckelpersoner i fjäderfänäringen): Rapport från forskningsprojekt om adenovirus hos kyckling (preliminär titel), Ylva, Lindgren