

Delrapport av projektet ”diagnostik av spädgrisdiarré- utveckling av en metod för att påvisa *Enterococcus hirae* i svabbprov från levande djur”

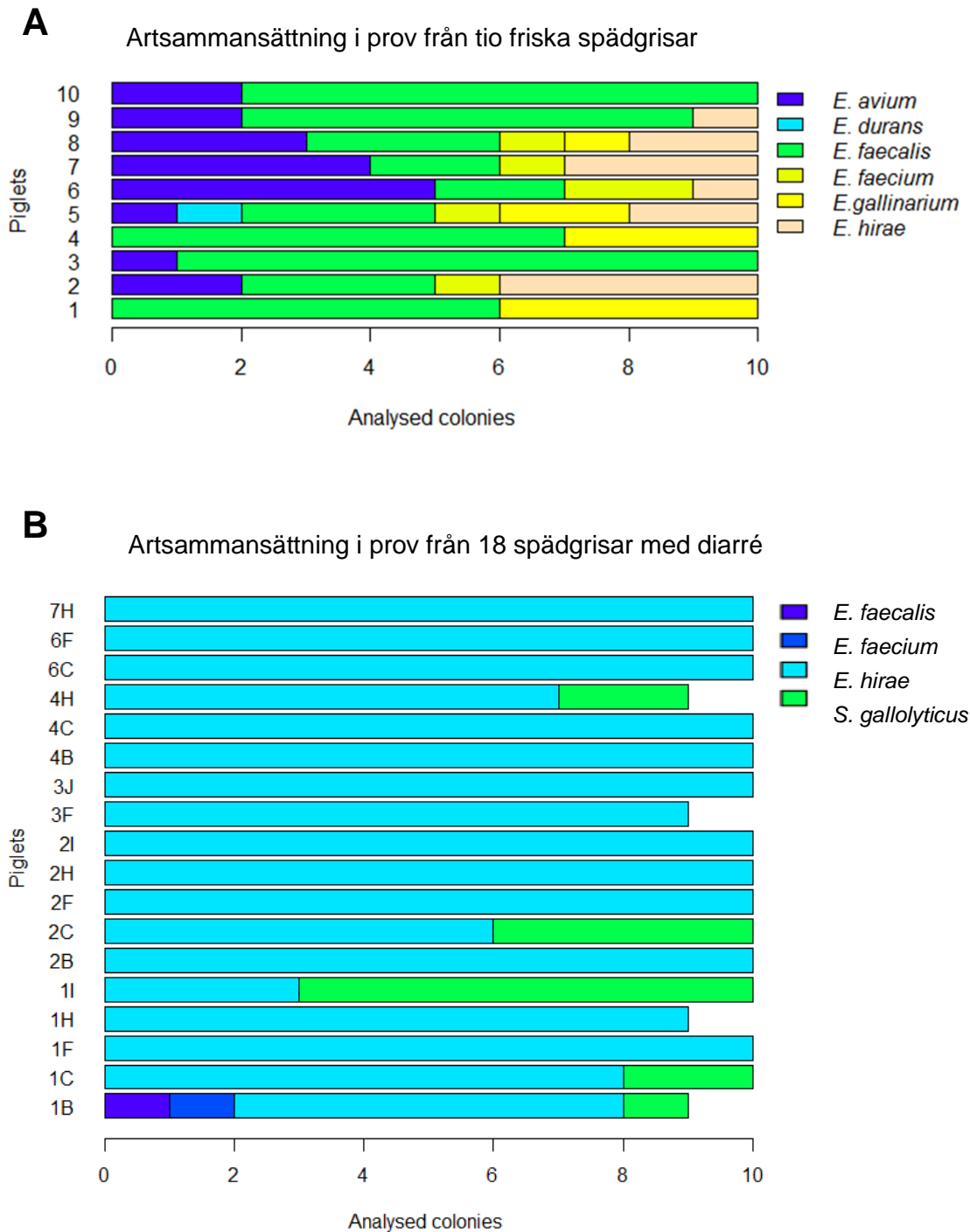
Syftet med det aktuella projektet var att öka kunskapen om *E. hirae*-orsakad spädgrisdiarré för att möjliggöra en förbättrad diagnostik. Specifika mål var att; 1) undersöka förekomsten av *E. hirae* hos friska spädgrisar, och 2) att karaktärisera bakterien *E. hirae* med syfte att identifiera skillnader mellan isolat från spädgrisar med misstänkt *E. hirae*-orsakad diarré och isolat från friska djur.

1. Förekomst av *E. hirae* hos friska spädgrisar

Prover för odling av enterokocker samlades in från grisbesättningen vid Lövsta forskningscentrum, en serobesättning som aldrig haft problem med spädgrisdiarré. Proven inkluderade ändtarmssvabbar från tio friska spädgrisar (en till tre dagar gamla) från fyra kullar och tio stycken nio veckor gamla grisar från olika boxar. Anledningen till att vi inkluderade en äldre ålderskategori var för att säkerställa att vi skulle erhålla *E. hirae*-isolat från friska djur. Att vi valde att ta prov från nio veckor gamla grisar istället för suggor (som angivet i projektplanen) baserades på en forskningsstudie som visar att man hittar *E. hirae* hos friska grisar vid denna ålder [1].

Prov från spädgrisarna uppvisade sparsam till riklig bakterieväxt på odlingsmedium som är selektivt för enterokocker. För att få en bild av enterokockfloras sammansättning artbestämdes tio bakteriekolonier per prov med hjälp av analysmetoden MALDI-TOF. Prov från de äldre grisarna uppvisade sparsam till måttlig bakterieväxt. På grund av den sparsamma växten var det inte möjligt att plocka tio kolonier för artbestämning från fem av de äldre grisarna. Totalt artbestämdes 170 bakterieisolat, varav 100 från spädgrisar och 70 från nio veckor gamla grisar.

Genom odling av svabbprov från ändtarmen kunde *E. hirae* påvisas hos sex av de tio spädgrisarna. *E. hirae* var dock inte den dominerade arten i något prov, se figur 1. Av tillväxtgrisarna var endast en gris positiv för *E. hirae*. Totalt erhöles 19 isolat av *E. hirae*, varav 13 kom från spädgrisar.



Figur 1. Diagram över artsammansättningen av enterokocker odlade från ändtarmsprover från spädgrisar. A) Prov från tio friska spädgrisar från en besättning utan problem med spädgrisdiarré. B) Prov från 18 grisar från sex besättningar där *E. hirae* misstänks orsaka diarré (data från tidigare studie för jämförelse [2]).

2. Skillnader mellan *E. hirae* isolerade från friska och sjuka djur

För att undersöka förekomst av genetiska skillnader mellan *E. hirae* förknippade med sjukdom och *E. hirae* som återfinns hos friska spädgrisar så valdes två isolat ut för helgenomsekvensering (kartläggning av hela arvsmassan). Isolatet från en sjuk gris, betecknat "E. hirae-2F2", isolerades i en tidigare studie [2]. Denna gris hade diarré och vid mikroskopisk undersökning av tarmen kunde man se Gram-positiva, rundformiga bakterier som fäste till tarmslemhinnan. Isolatet från en frisk spädgris, "E. hirae-S6-6" isolerades i den aktuella studien.

Sekvenseringen utfördes vid National Genomic Infrastructure (NGI) i Uppsala med sekvenseringsplattformen PacBio RSII (Pacific Biosciences). Sekvenseringen gav 45 075 sekvenser för E. hirae-2F2 och 84 023 sekvenser för E. hirae-S6-6. Sekvenserna sammanfogades till sammanhängande DNA-sekvenser (contiger) på NGI med hjälp av hierarkisk genom assembly (HGAP) i enlighet med Pacific Biosciences rekommendationer. Antal sammanhängande DNA-sekvenser för E. hirae-2F2 (sjuk) och E. hirae-S6-6 (frisk) ges i tabell 1.

	E. hirae-S6-6 (frisk)	E. hirae-2F2 (sjuk)
Antal contiger	3	4
Längsta contig (bp)	2 765 432	2 873 996
Total contig-längd (bp)	2 790 845	3 056 683

Bakteriers arvs massa (genom) består vanligen endast av en kromosom och i vissa fall en eller flera plasmider (mindre DNA- molekyler som kan överföras mellan bakterier). Den längre contigen i våra resultat stämmer storleksmässigt väl överens med *E. hiraes* kromosom [3]. Sedan tidigare finns det bara två plasmider som är fullständigt kartlagda hos *E. hirae*. De kortare contigerna matchar inte mot dessa plasmider. Om de kortare contigerna motsvarar plasmider som inte är beskrivna tidigare eller om de är gensegment som tillhör kromosomen går inte att säga säkert utifrån dessa data.

För att se vilka tidigare beskrivna gener som fanns i bakteriernas genom analyserades DNA-sekvenserna med verktyget Prokka [4]. Hos E. hirae-2F2 återfanns 603 tidigare beskrivna gener och 583 hos E. hirae-S6-6. Totalt uppskattas *E. hirae* ha ungefär 2800 proteinkodande gener vilket betyder att endast en mindre andel av dessa gener är beskrivna sedan tidigare [3]. En jämförelse av uppsättningen kända gener hos de två stammarna visar att E. hirae-2F2 har 85 gener som inte förekommer hos E. hirae-S6-6 och att E. hirae-S6-6 har 64 gener som inte finns hos E. hirae-2F2. Av de gener som enbart hittades hos E. hirae-2F2 återfanns dock inga gener av omedelbar betydelse för bakteriens sjukdomsframkallande förmåga.

Förekomst av gener som tidigare kopplats till sjukdomsframkallande förmåga analyserades även med hjälp av verktyget ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>) och databasen virulence finder (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>). Databasen som användes, "vfdb", innehåller ett stort antal bakteriella gener som visats överföra sjukdomsframkallande förmåga experimentellt (versionen som användes uppdaterades 17 mars, 2017 och innehöll totalt 2597 sekvenser). Samma tre gener (*bopD*, *bsh*, *clpP*) återfanns hos båda isolaten. Resultaten presenteras i tabell 2.

Tabell 2. Förekomst av gener kopplade till sjukdomsframkallande förmåga					
Contig	Gen	Coverage	% coverage	% identity	Databas
S6-6_contig_1	<i>bopD</i>	1-995/1011	98.02	75.876	vfdb
S6-6_contig_1	<i>bsh</i>	1-917/978	93.76	77.535	vfdb
S6-6_contig_1	<i>bsh</i>	1-917/978	93.76	77.754	vfdb
S6-6_contig_1	<i>clpP</i>	1-563/597	94.14	76.773	vfdb
S6-6_contig_3	<i>bsh</i>	1-917/978	93.76	77.754	vfdb
2F2_contig_1	<i>bopD</i>	1-1002/1011	98.71	75.746	vfdb
2F2_contig_1	<i>clpP</i>	1-563/597	94.14	76.950	vfdb
2F2_contig_1	<i>bsh</i>	1-917/978	93.76	77.644	vfdb

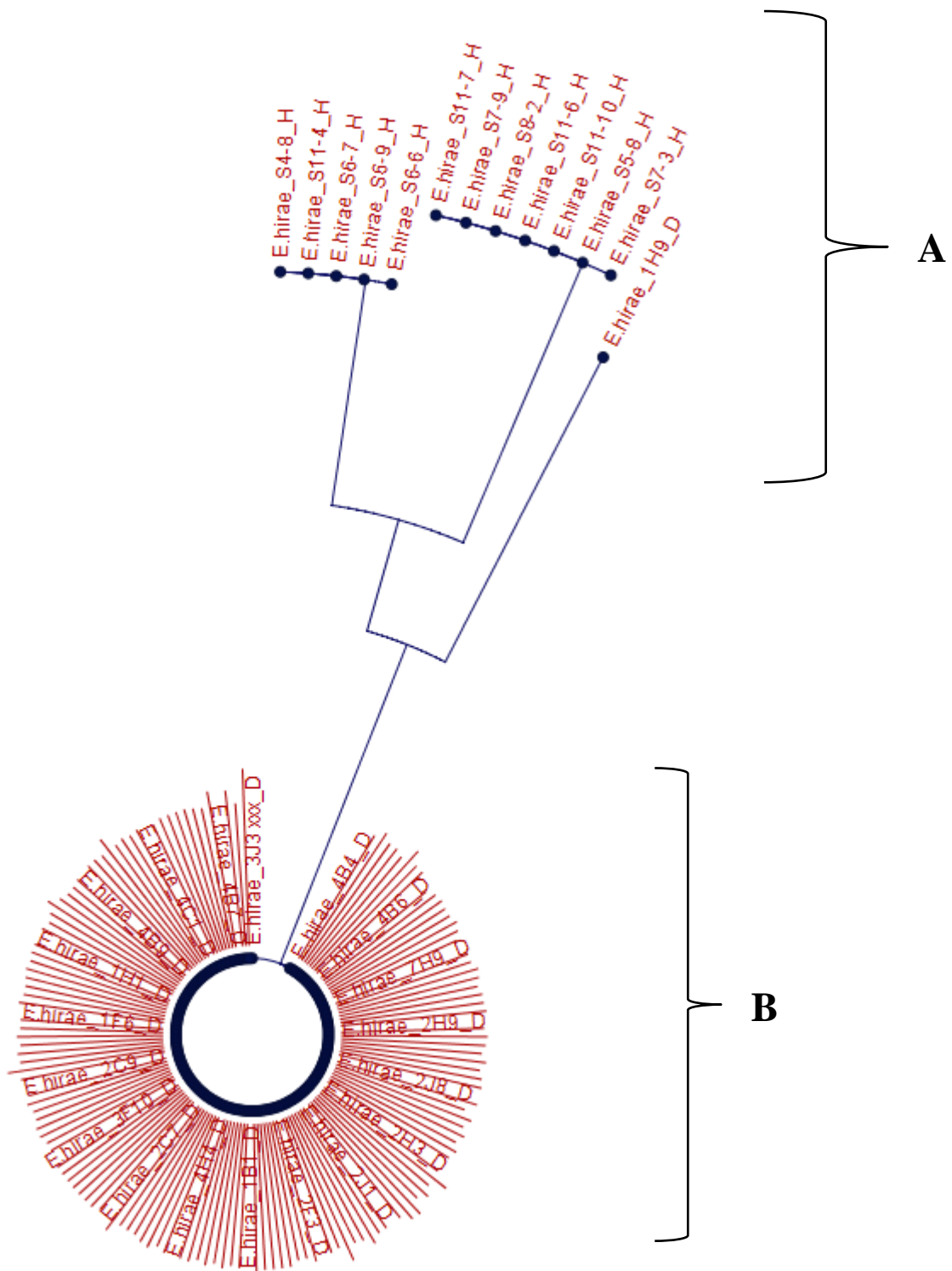
Analysen visade alltså ingen skillnad mellan *E. hirae*-2F2 och *E. hirae*-S6-6 avseende gener som tidigare kopplats till sjukdomsframkallande förmåga. Detta utesluter dock inte att det kan finnas andra genetiska skillnader av betydelse mellan dessa isolat.

För att öka säkerheten i resultaten genomfördes även helgenomsekvensering av *E. hirae*-S6-6 på sekvenseringsplattformen MinION (Oxford Nanopore Technologies) som finns vid SLU. Sekvenseringen genomfördes med en flödescell av modell FLO-MIN106. Sekvenseringsbibliotek förbereddes med Rapid Sequencing Kit SQK-RAD002 i enlighet med tillverkarens instruktioner. Sekvenseringen genererade 98 1927 sekvenser som sammanfogades till sex contiger med hjälp av verktyget Miniasm. Överlag stämmer datan väl överens med den som skapades av PacBio-plattformen vilket visar på MinIONs användbarhet för denna typ av studier. Fördelen med MinION är att kostnaden per analyserat genom är betydligt lägre vilket möjliggör att fler genom kan analyseras med samma resurser.

Eftersom inga gener av omedelbart intresse identifierades vid helgenomsekvenseringen utfördes istället en mer översiktlig screening av den genetiska variationen hos de insamlade *E. hirae*-isolaten. Undersökningen baserades på analys av genen *cpn60* som tidigare använts för att för att skilja på olika subgrupper av *E. hirae* [1].

Sammanlagt analyserades 171 isolat, 13 isolat från sex friska grisar från den aktuella studien och 158 isolat från 18 grisar med diarré insamlade i en tidigare studie (visas i figur 1). Grisarna med diarré kom från sex olika besättningar och hos samtliga kunde man se Gram-positiva, rundformiga bakterier fästa till tarmslemhinnan. Inga andra orsak till diarré kunde fastställas i dessa besättningar [2, 5].

Vid jämförelse av det ca 500 baspar långa genfragmentet av *cpn60* var sekvensen hos isolat från sjuka grisar i princip identisk men skiljde sig från *cpn60*-sekvensen hos isolat från friska grisar (figur 2). Det som är särskilt intressant är att isolaten från sjuka grisar är lika varandra trots att de kommer från 18 olika djur från sex olika besättningar. Detta stödjer hypotesen att det kan vara en särskild typ av *E. hirae* som är förknippad med diarré och att denna typ skiljer sig från *E. hirae* som finns i tarmen hos friska djur.



Figur 2. Fylogenetiskt träd över 171 isolat av *E. hirae* baserat på sekvensvariationer i genen *cpn60*.
 A) *cpn60*-sekvenser från 12 av totalt 13 *E. hirae*-isolat från sex friska spädgrisar från en besättning.
 B) *cpn60*-sekvenser från 157 av totalt 158 *E. hirae*-isolat från 18 spädgrisar med diarré från sex olika besättningar.

Slutsatser, vad har vi lärt oss från projektet?

Resultaten från projektet visar att *E. hirae* kan isoleras även från friska spädgrisar från besättningar utan problem med spädgrisdarré. **Detta innebär att påvisande av *E. hirae* genom odling från ändtarmen inte är tillräckligt för att diagnosticera ”*E. hirae*-orsakad” diarré.** Vid frågeställning om ett fall av spädgrisdarré är associerat med *E. hirae* bör odling därför alltid kombineras med histopatologisk undersökning av tarmen (för påvisande av Gram-positiva, rundformiga bakterier fästa till tarmslemhinnan).

Vi har genom jämförelse av isolat från friska spädgrisar (n=13) och spädgrisar med misstänkt *E. hirae*-diarré (n=158) även fått stöd för teorin **att *E. hirae* som är förknippad med spädgrisdarré skiljer sig från *E. hirae*-stammar som återfinns hos friska grisar.** Skillnaden som baseras på sekvensvariationer i genen *cpn60* behöver dock bekräftas genom analys av fler isolat från friska spädgrisar. Om det visar sig att endast en särskild typ av *E. hirae* är associerad med sjukdom så kan detta utnyttjas för att ta fram en specifik diagnostik.

Vad i arvsmassan som skulle kunna ligga bakom skillnaden i sjukdomsframkallande förmågan vet vi i nuläget inte. Vid analys av hela arvsmassan hos två isolat (från en frisk och en sjuk gris) kunde vi inte se någon skillnad i genuppsättning avseende gener som tidigare kopplats till sjukdomsframkallande förmåga. Denna undersökning ska dock ses som ett första steg och utesluter inte att det kan finnas andra genetiska skillnader av betydelse.

Sammantaget så har resultaten från detta projekt genererat ny värdefull kunskap om *E. hirae* och dess koppling till spädgrisdarré. Resultaten är lovande och har även möjliggjort ett större projekt finansierat av Formas, vilket påbörjades under 2017.

Vad återstår?

Det som återstår i projektet är att kommunicera och sprida resultaten ytterligare. Detta kommer ske genom publikation i en vetenskaplig tidskrift (med open access) samt presentationer (skriftlig och/eller muntlig) vid relevanta konferenser under 2018. Siktet är inställt på ”European symposium of porcine health management” i Barcelona i maj och på ”Prato Conference on the Pathogenesis of Animal and Zoonotic Bacterial Infections” i Prato i oktober.

Referenser

1. Vermette, C.J., et al., *Resolution of phenotypically distinct strains of Enterococcus spp. in a complex microbial community using cpn60 universal target sequencing*. Microb Ecol, 2010. **59**(1): p. 14-24.
2. Larsson, J., et al., *Neonatal Piglet Diarrhoea Associated with Enteroadherent Enterococcus hirae*. Journal of comparative pathology, 2014. **151**(2): p. 137-147.
3. Gaechter, T., et al., *Genome Sequence of Enterococcus hirae (Streptococcus faecalis) ATCC 9790, a Model Organism for the Study of Ion Transport, Bioenergetics, and Copper Homeostasis*. Journal of Bacteriology, 2012. **194**(18): p. 5126-5127.
4. Seemann, T., *Prokka: rapid prokaryotic genome annotation*. Bioinformatics, 2014: p. btu153.

5. Larsson, J., et al., *Pathological and bacteriological characterization of neonatal porcine diarrhoea of uncertain aetiology*. J Med Microbiol, 2015. **64**.