

SPÆDGRISEDIARRÉ – FOKUS PÅ LABORATORIEFUND OG DERES BETYDNING FOR DIAGNOSTIK

MEDDELELSE NR. 1106

Grise i problembesætninger adskiller sig ikke væsentligt fra grise i besætninger uden diarréproblemer. Forebyggelse af rotavirus kan formentlig løse problemerne i en del besætninger.

INSTITUTION: SEGES SVINEPRODUKTION, DTU VETERINÆRINSTITUTTET, AARHUS UNIVERSITET

FORFATTER: HANNE KONGSTED, KARL PEDERSEN, CHARLOTTE KRISTIANE HJULSAGER,
SVEN ERIK JORSAL, POUL BÆKBO

UDGIVET: 2. JUNI 2017

Dyregruppe: Pattegrise

Fagområde: Sundhed og sygdom

Nøgleord: Spædgrisediarré, diagnostik, rotavirus, *E. coli*, EAST-1, AIDA-1, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus hirae* / Arkiv: LFID-130-29589

Sammendrag

Resultater

Undersøgelsen viste, at rotavirus A er et vigtigt smitstof, som formentlig er årsag til spædgrisediarré i en del besætninger. Over halvdelen af de undersøgte besætninger var helt negative for rotavirus, så - i modsætning til hvad mange nok forventede - er dette virus ikke konstant til stede i pattegrise og påvisning har formentlig ofte betydning.

De klassiske *E. coli* bakterier (med virulensfaktorerne F4, F5, F6, LT, STa, STb), som man i de fleste besætninger vaccinerer imod, fandt vi meget få af i undersøgelsen. Vi brugte PCR (Polymerase Chain

Reaction) frem for traditionel serotypning til påvisning af potentielt sygdomsfremkaldende *E. coli* bakterier. Det viste sig, at to faktorer; EAST-1 (Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-1) og AIDA-1 (Adhesin involved in diffuse adherence-1) var meget hyppige. STb (Heat-stable toxin b) og fimbrietype F41 blev også påvist i et vist omfang. De to toxiner STb og EAST-1 sås hyppigere hos grise med diarré end hos raske kontrolgrise.

Undersøgelsen fandt ingen forbindelse mellem forekomst af diarré og forekomst af bakterierne *Enterococcus hirae* og *Clostridium difficile* samt *Clostridium perfringens* type A med beta2 gener. Alle grise var negative for *Clostridium perfringens* type C (tarmbrand).

Når vi sammenlignede obduktionsfund hos diarrégrise fra problembesætninger (case-besætninger) med diarrégrise fra besætninger uden væsentlige diarréproblemer (kontrolbesætninger), var der flere sultgrise (= grise med tom mave og tom tyndtarm) og grise med slappe tyktarme i case-besætningerne. I forhold til smitstoffer var rotavirus lidt mere udbredt i case-besætningerne, men der kunne generelt ikke påvises specielle smitstoffer i case-besætningerne, som ikke også kunne påvises i kontrolbesætningerne.

Materialer og metoder

I alt 60 besætninger (38 case- og 22 kontrolbesætninger) medvirkede i undersøgelsen. Hver besætning indsendte fire aflivede grise med diarré og to aflivede raske grise i alderen 1-5 dage. Grisene blev obduceret efter et fastlagt skema på Laboratorium for Svinesygdomme i Kjellerup.

Tarmindholdet blev undersøgt for *E. coli*, *Enterococcus hirae*, rotavirus A, *Clostridium difficile* og *Clostridium perfringens*. De fire sidstnævnte smitstoffer blev undersøgt enkeltvis på samtlige grise (230 diarrégrise og 125 raske grise), hvorimod *E. coli* undersøgelserne i første omgang blev udført på besætningsniveau.

E. coli kolonier dyrket fra tarmindhold af individuelle grise blev samlet i besætningspools og undersøgt ved PCR. PCR-undersøgelserne blev lavet trinvist. Først blev alle pools testet for evnen til (det vil sige gener for) at producere toxinerne LT (Heat-labile enterotoxin), STa (Heat-stable toxin), STb (Heat-stable toxin b) og EAST-1 (Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-1). Pools, der var positive for mindst et toxin, blev derefter testet for evnen til at sidde fast på tarmvæggen (= adhæsions gener: Fimbrie-generne F4, F5, F6, F18 og F41 samt AIDA-1 (Adhesin involved in diffuse adherence-1)). Ud fra de poolede resultater blev det til slut udvalgt, hvilke faktorer der var relevante at undersøge på enkeltdyrsniveau. Følgende faktorer blev undersøgt på enkeltdyrsniveau: EAST-1 og STb (testet på 89 enkeltdyr fra besætninger, hvor der var påvist både toxin- og adhæsionsgener i én pool fra en besætning) samt AIDA-1 og F41 (testet på 30 enkeltdyr, som var toxinpositive).

Forekomst af *Enterococcus hirae* blev undersøgt ved dyrkning af tarmindehold og efterfølgende identifikation ved MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). Rotavirus A, *Clostridium difficile* og *Clostridium perfringens* blev påvist ved PCR (for alfa-, beta- og beta2gener) på tarmindehold.

Alle PCR-undersøgelser samt dyrkning og MALDI-TOF-undersøgelser for *Enterococcus hirae* blev foretaget på DTU Veterinærinstituttet.

Baggrund

En del besætninger dør med diarré inden for den første leveuge. "NNPD", og tidligere undersøgelser har fokuseret på, om problemerne skyldes en ny smitte i landet [1], [2]. Som situationen er nu, er der ikke klare indikationer på, at problemer skyldes en specifik smitte. De praktiske erfaringer med at kontrollere problemerne har til gengæld vist, at management-ændringer ofte kan reducere eller helt fjerne problemerne. En tidligere meddelelse [3] viser resultaterne fra en spørgeskemaundersøgelse vedrørende managementforhold, der blev udført parallelt med undersøgelserne i denne meddelelse. Spørgeskemaundersøgelsen pegede på, at udtørring af farestalden inden indsættelse af søer, konstant varme i farestalden, tørfodring af søer og lav forekomst af MMA (Mastitis Metritis Agalacti) hos søer nedsætter risikoen for spædgrisediarré.

Når justeringer i det daglige management ikke udbedrer problemerne, er det oplagt at undersøge grise på laboratoriet. Her er der imidlertid brug for bedre diagnostiske metoder. Én af udfordringerne er, at de smitstoffer, der traditionelt har været vigtige – som klassiske *E. coli* og *Clostridium perfringens* type C (tarmbrandsbakterier) - efterhånden ser ud til at være mindre betydende. Derfor inkluderede vi en række andre smitstoffer og *E. coli* virulensfaktorer i denne undersøgelse.

Formålet med undersøgelsen var overordnet set at oparbejde viden om, hvilke laboratoriefund der er relevante i forbindelse med spædgrisediarré for at forbedre den diagnostiske tilgang til problemet. Den nuværende rutine med O-serotyping af *E. coli* er måske forældet i forhold til de aktuelle problemer, og undersøgelsen forsøger derfor en alternativ tilgang med brug af PCR. Diagnostikken af *Clostridium perfringens* type A diarré volder også problemer. Tilstedeværelse af bakterien i tarmindeholdet har ikke sammenhæng med forekomst af diarré [1]. Så hvis bakterien har klinisk betydning, ser det ud til, at sygdommen skal diagnosticeres på en anden måde. Her har det været foreslået, at påvisning af gener for beta2-toxin kunne være relevant [4].

Nylige undersøgelser har tydet på, at *E. coli* med gener for et særligt toxin, EAST-1, *Clostridium difficile* og *Enterococcus hirae* og rotavirus A kan spille en rolle for udviklingen af diarré [5], [6], [7], [8].

Denne undersøgelse sammenlignede grise med og uden diarré fra besætninger henholdsvis med og uden væsentlige kliniske diarréproblemer. Vores ambition var at se på, om vi kunne udpege objektive forskelle på grise fra problem- og ikke-problem besætninger og dermed komme nærmere på, hvorfor nogle besætninger har store problemer og andre ikke har. En af de forudgående formodninger var, at grise fra ikke-problem besætninger ofte ville lide af sultrelateret diarré – på grund af sporadiske dårligt malkende søer – hvorimod grise fra problembesætninger ville have diarré af andre og måske infektiøse årsager.

Uanset udfaldet af det sammenlignende studie havde undersøgelsen det formål at påpege, hvilke smitstoffer der er relevante i forhold til fremtidig laboratoriediagnostik og eventuel udvikling/brug af vacciner.

Materialer og metoder

Besætninger og grise

Studiet var designet som et case/kontrol-studie på både besætnings- og griseniveau. Besætningerne deltog i perioden fra oktober 2013 til oktober 2014 og var alle udvalgt af deres praktiserende dyrlæge. Besætningerne blev kategoriseret som enten case- (problem) eller kontrolbesætning (ikke-problem). En case-besætning blev defineret som en besætning, hvor mindst 25 % af kuldene havde haft diarré i den første leveuge i de senere faringsrunder. En kontrolbesætning blev defineret som en besætning, hvor maksimalt 10 % af kuldene havde haft diarré inden for det sidste halve år. Der var af praktiske årsager ikke krav om en præcis optælling af diarréforekomsten forud for undersøgelsen.

Vi kontaktede de praktiserende dyrlæger telefonisk og indgik en aftale med de interesserede om at udvælge case- og kontrolbesætninger, gennemføre spørgeskemainterviews og indsende grise til Laboratorium for Svinesygdomme i Kjellerup.

Fra hver besætning bad vi om at få udvalgt fire grise med diarré og to grise uden diarré – alle i alderen 1-5 dage og alle udvalgt fra forskellige kuld. Ingen af de indsendte grise måtte være behandlet med antibiotika for diarré, men vi udelukkede ikke besætninger, der brugte antibiotikabehandling ved fødsel.

Enkelte besætninger indsendte tre diarrégrise frem for fire. Datamaterialet endte med at bestå af 38 case-besætninger og 22 kontrolbesætninger og i alt 355 grise (230 med diarré og 125 uden).

Obduktion

Grisene blev aflivet i besætningerne og sendt til Laboratorium for Svinesygdomme i Kjellerup, hvor de blev obduceret dagen efter aflivning. Alle grisene blev obduceret efter et standardiseret skema. Tabel 1 viser, hvilke parametre der indgik i obduktionen, og hvordan disse parametre kunne registreres.

Tabel 1. Parametre, der blev vurderet ved obduktion af grisene

Parameter	Registreringsmuligheder
Køn	Han/ hun
Huld	Under middel/ middel
Diarrétilsmudsning omkring anus	Ja/ nej
Dehydrering (tør muskulatur)	Ja/ nej
Lungesygdom	Ja/ nej
Mavens fyldning	Tom/ halvfyldt og derover
Lymfegange i tyndtarmskrøs	Synlige hvide strenge/ ingen synlige strenge
Lymfeknuder i tyndtarmskrøs	Forstørrede/ normale
Udvendigt udseende af tarme*	Normalt sammentrukne/ slappe/ stive/ tyndvæggede
Konsistens af tarmindehold*	Normalt/ vandigt/ intet eller næsten intet indhold
Tarmslimhinde*	Normalt udseende/ mat/ vævsdød (nekrose)
Ødem i stortarmskrøs	Intet/ let/ markant (størrelse som diameter af tarm eller større)
Lymfeknuder i stortarmskrøs	Forstørrede/ normale

*: Parametrene er undersøgt i både tynd- og tyktarm

Undersøgelser for bakterier og virus

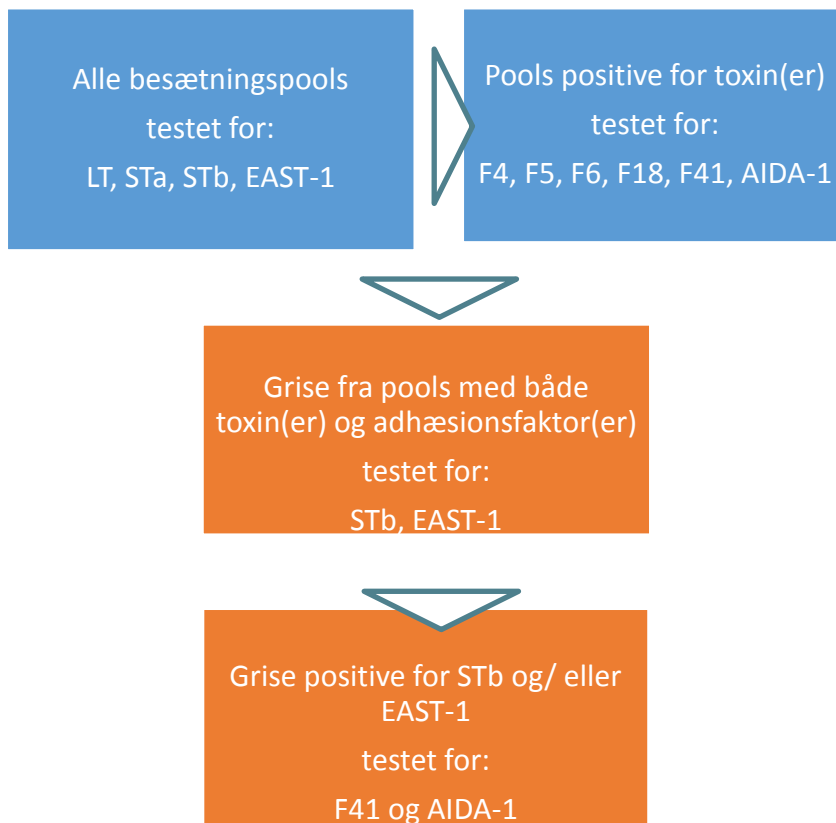
I forbindelse med obduktionerne blev der fra alle grise udtaget tarmstykker eller tarmindehold til analyse for bakterier og virus.

Forekomst af *E. coli* bakterier blev undersøgt ved dyrkning af tyndtarmsindhold. Fra hver gris med positiv dyrkning (uanset hvor mange kolonier, der blev påvist) udvalgte vi to bakterieisolater, som indgik i en samlet besætningspool. Hæmolytiske isolater blev prioriteret, hvis de var til stede.

Besætningspools (en pool pr. besætning med op til 12 bakterieisolater fra både diarrégrise og raske grise) blev sendt til PCR-undersøgelse på DTU Veterinærinstituttet. Samtidigt gemte vi isolaterne enkeltvis, så vi kunne vende tilbage og kigge på enkeltdyrs resultater ved behov.

PCR-undersøgelser blev lavet trinvist for at spare på udgifterne. Alle pools blev undersøgt for fire forskellige toxingener (gener der gør, at bakterien kan producere giftstoffer). Ud fra disse resultater udvalgte vi pools til undersøgelse for adhæsionsgener (gener der gør, at bakterien kan hænge fast på slimhinden og forvolde skade med sit toxin). Resultaterne fra de poolede undersøgelser blev brugt til at vurdere, hvilke faktorer der var så hyppigt forekommende, at de var relevante at undersøge på enkeltdyrsniveau. Igen valgte vi at starte med toxin-undersøgelser. Grise, der var toxin-positive, blev efterfølgende testet for relevante adhæsionsgener. Der blev testet to isolater pr. gris. En gris blev bedømt positiv for et toxin-/adhæsionsgen, hvis minimum ét af de to isolater var positivt.

Den trinvise PCR-analyse for *E. coli* virulensfaktorer er illustreret i figur 1.



Figur 1. Undersøgelserforløb ved PCR for *E. coli* virulensfaktorer. LT: Heat-labile enterotoxin, STa: Heat-stable toxin a, STb: Heat-stable toxin b, EAST-1: Enteroaggregative Escherichia coli heat-stable Enterotoxin-1, AIDA-1: Adhesin involved in diffuse adherence-1, F4, F5, F6, F18 og F41: Forskellige fimbrietyper

Enterococcus hirae blev påvist ved dyrkning og identificeret ved Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF). Vi opgjorde dels 1) hvor mange grise, der var positive for bakterien og 2) hvor mange grise, der var massivt positive for bakterien (det vil sige med renkultur eller næsten renkultur ved dyrkning).

Rotavirus A og *Clostridium difficile* og *Clostridium perfringens* blev påvist ved PCR. Med hensyn til *Clostridium perfringens* undersøgte vi specifikt for forekomst af toxingerne; alfa-, beta og beta2. Samtidig påvisning af alfa- og betagener tolkes som fund af *Clostridium perfringens* type C. Samtidig påvisning af alfa- og beta2gener, tolkes som påvisning af *Clostridium perfringens* type A med beta2gener (CpA-beta2). Prøver med påvisning af beta-/toxinger uden samtidig påvisning af alfa-toxinger blev tolket som fejl og dømt negative for *Clostridium perfringens*.

Statistik

Statistiske sammenhænge mellem forekomsten af obduktionsfund hos diarrégrise kontra raske grise blev testet ved hjælp af Fisher's exact tests. Bakterie-/virusfund blev evalueret på samme måde, samtidigt med at vi lavede en besætningsvis sammenligning, hvor en besætning blev anset som positiv, hvis mindst én af seks undersøgte grise var positiv for et givent smitstof.

Resultater og diskussion

Obduktionsfund hos diarrégrise og raske grise

Resultater fra obduktionerne af diarrégrise og raske grise fremgår af tabel 2.

Tabel 2. Obduktionsfund hos 230 diarrégrise og 125 raske grise fra 60 forskellige besætninger

	Diarrégrise (n=230)	Raske grise (n=125)	P-værdi*
Udvendige fund:			
Hankøn	127 (55 %)	72 (58 %)	0,9
Huld under middel	107 (47 %)	35 (28 %)	< 0,001
Diarrétilsmudsning omkring endetarmen	141 (61 %)	11 (9 %)	< 0,001
Dehydrering (tør muskulatur)	33 (14 %)	1 (1 %)	< 0,001
Indvendige fund:			
Tom# mave	49 (21 %)	42 (34 %)	< 0,001
Tom# tyndtarm	17 (7 %)	3 (2 %)	0,06
Tom# tyktarm	24 (10 %)	6 (5 %)	0,07
Ikke-synlige lymfegange i tarmkrøs**	131 (60 %)	56 (47 %)	0,02
Slap tyndtarm	105 (46 %)	37 (30 %)	0,002
Vandigt indhold i tyndtarm	68 (30 %)	27 (22 %)	< 0,001
Forstørrede lymfeknuder i tyndtarmskrøs	50 (22 %)	15 (12 %)	0,4
Ødem i tyktarmskrøs [§]	15 (7 %)	9 (7 %)	1
Slap tyktarm	107 (47 %)	14 (11 %)	< 0,001
Vandigt indhold i tyktarm	134 (58 %)	9 (7 %)	< 0,001
Forstørrede lymfeknuder i tyktarmskrøs	16 (7 %)	9 (7 %)	1

*: To-sidet Fischer's exact test. #: Intet/stort set intet synligt indhold. **: 6 % af de 187 grise med ikke-synlige lymfegange havde en tom tyndtarm. Registreringen manglede for 18 grise fra tre besætninger. §: Én diarrégris og to raske grise havde markant ødem

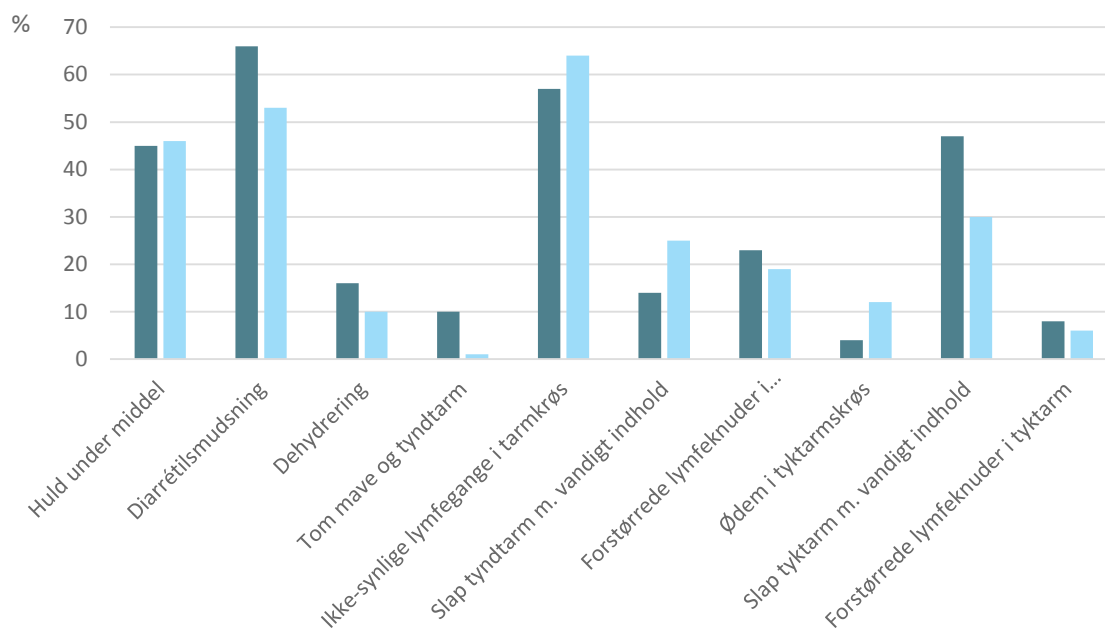
At de udvendige fund – huld, diarrétilsmudsning og dehydrering – var markant forskellige hos de to typer af grise er ikke overraskende, da de delvist har været udvalgt ud fra disse parametre. Med hensyn til de indvendige fund var der til gengæld flere interessante forskelle. Det første overraskende fund var, at færre diarrégrise end raske grise havde tomme maver. Det strider umiddelbart imod den opfattelse, at manglende mælkeoptag giver sult-diarré. Tomme tyndtarme var dog hyppigere forekommende hos diarrégrise end hos kontrolgrise (7 % kontra 2 %, P=0,06), og det tyder måske på, at tomme tarme er et mere reelt tegn på sult. I det følgende betragter vi kombinationen af tom mave og tom tyndtarm som en indikation på sult, og det er derfor kombinationen, der ses på, ved sammenligning af fund i case- og kontrolbesætninger.

Lymfegangene i tarmkrøset indeholder hvid chylus, som er en blanding af lymfevæske og fedtpartikler optaget fra tarmindholdet. Det er påfaldende, at der hos 60 % af grisene med diarré ikke var chylus at se. Det gjaldt kun for 47 % af de raske grise ($P=0,02$). Der kunne måske være den biologiske forklaring (for den er ikke forklaret af manglende tarmindhold, se tabel 2), at diarrégrise har et nedsat fedtoptag.

Slaphed af tarmene var i undersøgelsen klart hyppigst hos diarrégrisene og er generelt set også et af de mest almindelige fund ved spædgrisediarré [9]. Her ser det ud til, at især en slap tyktarm har en stærk sammenhæng med diarré. Kombinationen af en slap tyktarm og vandigt indhold i tyktarmen sås hos 41 % af diarrégrisene og kun 6 % af de raske grise ($P<0,001$). Kombinationen af en slap tyndtarm og vandigt tyndtarmsindhold sås hos henholdsvis 19 % og 11 % af de to typer af grise ($P=0,07$). I diagnostisk sammenhæng bør man derfor især fokusere på tyktarmens udseende og indhold.

Obduktionsfund i case- og kontrolbesætninger

Figur 2 viser, hvor stor en andel af diarrégrisene i henholdsvis case- og kontrolbesætninger der havde de forskellige obduktionsfund. Søjlerne i figuren repræsenterer en gennemsnitlig andel af grise, der havde det enkelte fund i henholdsvis case- og kontrolbesætninger (hvis der var indsendt fire diarrégrise kunne den enkelte besætning have enten 0 %, 25 %, 50 %, 75 % eller 100 % positive grise).



Figur 2. Andel af diarrégrise med forskellige obduktionsfund (der er obduceret tre eller fire diarrégrise pr. besætning) i 38 case- (mørke kolonner) og 22 kontrolbesætninger (lyse kolonner)

Som det fremgår af figur 2, var tomme maver og tyndtarme hyppigere i case-besætningerne. Det ser således ud til, at grisene i de klinisk påvirkede besætninger har større tendens til nedsat mælkeoptag end grise i de besætninger, der ikke oplever kliniske problemer. Der kan være tale om både årsag og virkning, men en logisk forklaring kan måske være, at flere grise fra problembesætninger ikke kommer til yveret, fordi de i højere grad er svækket af diarré. Selv om resultaterne ikke viser, hvorvidt der er tale om årsag eller virkning, kan vi slå fast, at formodningen om, at diarrégrise i kontrolbesætninger hyppigere ville lide af sultrelateret diarré end diarrégrise fra case-besætninger ikke blev bekræftet. I case-besætningerne var der gennemsnitligt 10 % med tom mave/tyndtarm, mens det kun sås hos gennemsnitligt 1 % af grisene i kontrolbesætningerne (P=0,001).

Undersøgelser for *E. coli*

De dyrkede *E. coli*-bakterier var i altovervejende grad (98 %) non-hæmolytiske, og de fleste grise (72 %) havde moderat til massiv forekomst af *E. coli*-bakterier i tarmen. Enkelte grise var helt negative for *E. coli*-bakterier ved dyrkning og vi endte derfor med at have pools med mellem 8 og 12 bakteriekolonier pr. besætning.

Tabel 3 viser resultaterne for de toxingener, der blev testet på alle 60 besætningspools. Som det fremgår, var gener for EAST-1 hyppigt forekommende i begge typer af besætninger, men også toxin-genet STb var nogenlunde hyppigt.

Tabel 3. PCR-resultater for *E. coli* toxingener fra 38 case-besætningspools og 22 kontrolbesætningspools

	Case-besætningspools (n=38)	Kontrolbesætningspools (n=22)	P-værdi*
LT	0 (0 %)	0 (0 %)	1
STa	2 (5 %)	0 (0 %)	0,5
STb	7 (18 %)	4 (18 %)	1
EAST-1**	5 (13 %)	2 (9 %)	0,7

*: To-sidet Fisher's exact test. **: Tabellen viser kun de pools, der var stærkt positive for EAST-1, og som blev undersøgt nærmere. Derudover var 18 case-besætningspools og 11 Kontrolbesætningspools svagt positive

18 besætningspools (12 fra case-besætninger og seks fra kontrolbesætninger) indeholdt toxingener og blev derfor testet for adhæsionsgener (F4, F5, F6, F18, F41 og AIDA-1). Hverken F4, F6 eller F18 blev påvist. F5 blev påvist i en enkelt case-besætningspool, F41 i fire case-besætningspools og AIDA-1 blev påvist i 10 besætningspools (seks fra case-besætninger og fire fra kontrolbesætninger).

11 besætningspools (syv fra case-besætninger og fire fra kontrolbesætninger) viste sig at være positive for både toxingener og adhæsionsgener.

Grise fra besætningspools, der var positive for både toxingener og adhæsionsgener (i alt 63 grise fra de 11 besætningspools), blev testet individuelt for toxingenerne STb og EAST-1. Der blev ikke undersøgt for LT og STa på enkeltdyr, da vi vurderede, at forekomsten var så lav i de poolede prøver,

at det ikke var relevant. I alt 24 grise var positive for toxingener og blev efterfølgende testet for adhæsiionsgenerne F41 og AIDA-1. Tabel 4 giver et samlet overblik over kombinationen af virulensfaktorer i de isolater, der blev undersøgt fra enkelt dyr. F41 blev ikke påvist i isolater fra de udvalgte enkelt dyr.

Tabel 4. PCR-resultater for *E.coli* EAST-1, STb, F41 og AIDA-1 fra 20 grise med diarré og fire raske grise

Kombination af virulensfaktorer	Diarrégrise (n=20)	Raske grise (n=4)
EAST-1/STb/AIDA-1	13	3
EAST-1/AIDA-1	1	0
EAST-1	6	1

Som det fremgår af tabellen, var i alt 17 af de 24 testede grise positive for både toxingen(er) og adhæsiionsgen.

Undersøgelser for enterokokker, clostridier og rotavirus i diarrégrise og raske grise.

Omtrent halvdelen af alle grisene var positive for *Enterococcus hirae* (uafhængigt af diarréstatus).

Talmæssigt var der lidt flere af diarrégrisene (13 % kontra 8 %, (P=0,2)), der havde massiv forekomst af disse bakterier i tarmen. Cirka 60 % af grisene var positive for *Clostridium difficile*, uden sammenhæng med, om grisene havde diarré eller ej.

I alt 332 grise (94 %) testedes positiv for *Clostridium perfringens* alfa-toxingener. Stort set alle af disse (97 %) var samtidigt positive for beta2-gener og blev bedømt som CpA-beta2-positive. Betagener, som kun findes hos *Clostridium perfringens* type C, blev ikke påvist. At der kun var 3 % af de alfa-positive grise, der testedes negativ for beta2-gener er et vigtigt resultat, da det viser, at *Clostridium perfringens* type A fra grise stort set altid har beta2-gener.

Som det eneste af de smitstoffer der blev testet for i alle grise, havde rotavirus A en statistisk sikker sammenhæng med forekomst af diarré. 23 % af diarrégrisene og kun 6 % af de raske grise fik påvist rotavirus (P<0,001).

Samlede resultater for påvisning af *Enterococcus hirae*, rotavirus A, *Clostridium difficile* og CpA-beta2 vises i tabel 5. For langt de fleste smitstoffer, der findes i tarmkanalen og kan give diarré, vil det gælde, at de også kan være til stede uden at give diarré [10]. Man skal derfor ikke forvente, at raske grise altid er negative for de smitstoffer, som er sygdomsfremkaldende. I tilfælde, som ved *Clostridium difficile* og CpA-beta2, hvor 60-90 % af alle testede grise er positive er det dog meget svært at tro på en reel sammenhæng til diarré.

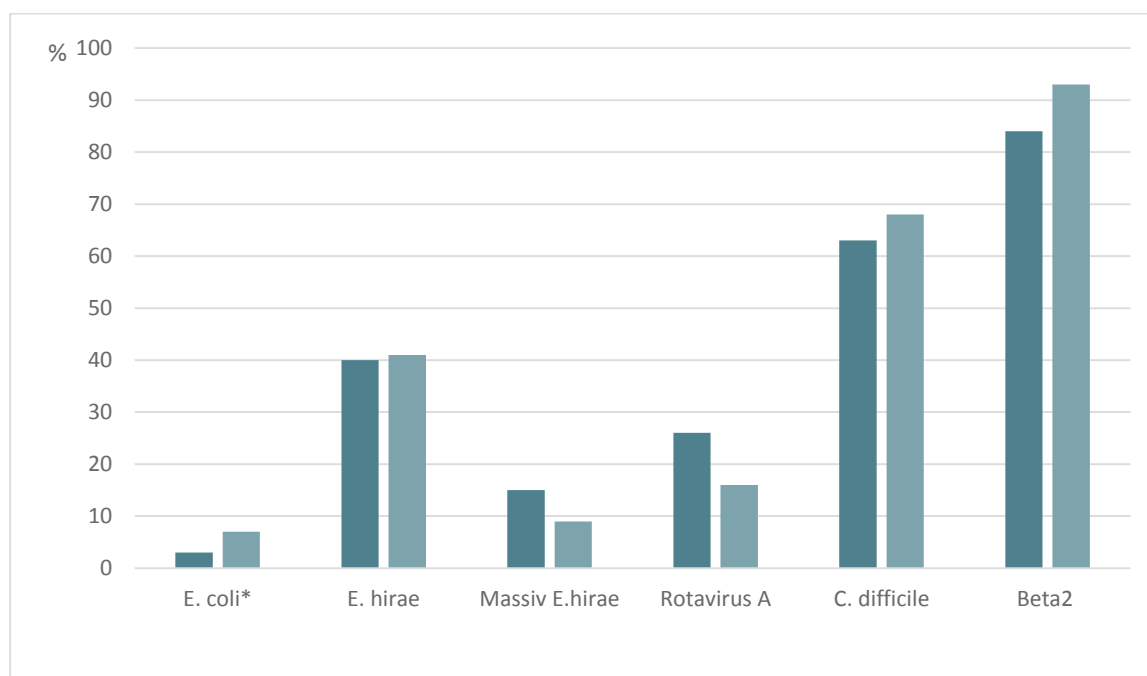
Tabel 5. Påvisning af *Enterococcus hirae*, rotavirus A, *Clostridium difficile* og CpA-beta2 i grise med og uden diarré fra i alt 60 besætninger. Enterokok-resultaterne vises både som simpel påvisning (*Enterococcus hirae*) og påvisning i massiv grad (Massiv *Enterococcus hirae*)

	Diarrégrise (n=230)	Raske grise (n=125)	P-værdi*
<i>Enterococcus hirae</i>	92 (40 %)	57 (46 %)	0,3
Massiv <i>Enterococcus hirae</i>	31 (13 %)	10 (8 %)	0,2
Rotavirus A	52 (23 %)	7 (6 %)	< 0,001
<i>Clostridium difficile</i>	149 (65 %)	74 (59 %)	0,3
CpA-beta2**	208 (90 %)	115 (92 %)	0,7

*: To-sidet Fisher's exact test. **: Clostridium perfringens type A med beta2-gener

Fund af smitstoffer i besætninger.

I figur 2 vises andelen af diarrégrise med påvisning af de forskellige bakterier og virus i henholdsvis case- og kontrolbesætninger. Søjlerne i figuren repræsenterer en gennemsnitlig andel af grise, der er positive for det enkelte smitstof i henholdsvis case- og kontrolbesætninger (hvis der er indsendt fire diarrégrise kan man inden for den enkelte besætning have enten 0 %, 25 %, 50 %, 75 % eller 100 % positive grise). Som det fremgår af tidligere afsnit, blev ikke alle enkeltgrise testet for *E. coli* EAST-1 og STb virulensfaktorer. Som figuren viser, indgår der for disse faktorer grise fra 12 case-besætninger og fem kontrolbesætninger (i alt 60 grise).



Figur 3. Andelen af diarrégrise i henholdsvis 38 case- (mørke søjler) og 22 kontrolbesætninger (lyse søjler), hvor der er påvist de forskellige smitstoffer. Der er undersøgt 3-4 grise pr. besætning.

*: *E.coli* undersøgelser er udført efter en særskilt procedure (se teksten under "Undersøgelser for E.coli"). Figuren henviser til sygdomsfremkaldende *E.coli* (bakterier med både toxin- og adhæsiionsgener) undersøgt på 230 grise fra case-besætninger og 125 grise fra kontrolbesætninger

Figur 3 fortæller, at det ikke ser ud til at være tilstedeværelsen af specifikke smitstoffer, der forklarer, at nogle besætninger har problemer, mens andre ikke har. De fleste smitstoffer forekommer med nogenlunde ens hyppighed i diarrégrise fra besætninger med og uden kliniske problemer. Den hyppigere forekomst af rotavirus A hos diarrégrise i case-besætninger kunne dog tyde på, at virusset delvist forklarer diarréproblemet i besætningen. Men også dette smitstof forekommer i besætninger uden væsentlige diarréproblemer.

Ved rutinemæssige laboratorieundersøgelser betragter man ofte en besætning som positiv for et givent smitstof, hvis bare én af de undersøgte grise (ud af 3-5 indsendte) testes positivt. Hvis vi bruger samme tilgang i forhold til smitstofferne i denne undersøgelse, får vi resultaterne i tabel 6.

Tabel 6. Påviste smitstoffer i case- og kontrolbesætninger. En besætning regnes som positiv, hvis minimum én gris (af de 5-6 undersøgte) er positiv. Der er ikke opdelt i grise med og uden diarré

	Case-besætninger (n=38)	Kontrolbesætninger (n=22)	P-værdi*
<i>Enterococcus hirae</i>	34 (89 %)	20 (91 %)	1
Rotavirus A	14 (37 %)	9 (41 %)	0,8
<i>Clostridium difficile</i>	35 (92 %)	21 (95 %)	1
CpA-beta2	38 (100 %)	22 (100 %)	1
<i>E. coli</i> *	6 (16 %)	4 (18 %)	1

*: To-sidet Fisher's exact test.

*: Sygdomsfremkaldende E.coli (AIDA-1/ EAST-1/ STb påvist)

Som ventet er der heller ikke forskel på forekomst af smitstofferne i case- og kontrolbesætningerne, når man bruger denne tilgang. Hvad der er mere interessant i forhold til den daglige diagnostik er, at ikke alle smitstofferne er lige almindelige at påvise. Som det fremgår af tabellen, er op mod 100 % af besætningerne positive for *Enterococcus hirae*, *Clostridium difficile* og *Clostridium perfringens* type A, når man bedømmer en besætning positiv efter et enkelt positivt fund. Resultatet for rotavirus A er markant anderledes. Her er der cirka 60 % af besætningerne, der er negative. I modsætning til de andre smitstoffer, er rotavirus A således ikke altid tilstede i enhver besætning inden for den første leveuge.

Konklusion

Undersøgelsen viste, at rotavirus A har betydning for diarré i den første leveuge. Virusset er tilsyneladende relativt sjældent forekommende i aldersgruppen, men når det optræder, har det formentlig sygdomsmæssig betydning. Laboratoriemæssig påvisning af virusset bør føre til overvejelser om vaccination.

Undersøgelsen bekræftede vores fornemmelse af, at traditionelle *E. coli* bakterier med fimbrier som adhæsionsfaktorer er sjældne i danske spædgrise. Dette indikerer, at de eksisterende fimbrie-vacciner mod *E. coli* har god effekt. AIDA-1 var den hyppigste *E. coli* adhæsionsfaktor i undersøgelsen og de hyppigste *E. coli* toxiner var STb og EAST-1. Kun i meget få tilfælde påviste vi samtidig forekomst af gener for adhæsin(er) og toxin(er), hvilket er en forudsætning for fremkaldelse af diarré.

Undersøgelsen giver derfor ikke anledning til at anbefale supplerende virulensfaktor-undersøgelser til den allerede eksisterende *E. coli* diagnostik på danske laboratorier.

Vi fandt ingen sammenhæng mellem diarré og forekomst af *Enterococcus hirae*, *Clostridium difficile* eller *Clostridium perfringens* type A med beta2-gener. Disse smitstoffer var til stede i stort set alle besætninger og i en meget stor del af grisene – uanset om de havde diarré eller ej.

Tomme maver og tomme tyndtarme som tegn på en længere periode uden mælkeoptag forekom hyppigere blandt diarrégrise end blandt raske grise og hyppigere i problembesætninger end ikke-problembesætninger. Hvad enten sulttilstanden var årsag eller virkning i forhold til diarréproblemet, viser det, at der skal fokuseres på mælkeforsyning/supplerende energiforsyning til grise med diarré.

Referencer

[1]	Kongsted, H.; Jonach, B.; Haugegaard, S.; Angen, Ø.; Jorsal, S.E.; Kokotovic, B.; Larsen, L.E.; Jensen, T.K.; Nielsen, J.P. (2013): Microbiological, pathological and histological findings in four danish pig herds affected by a new neonatal diarrhoea syndrome. BMC Veterinary Research, 9:206.
[2]	Kongsted, H.; Jonach, B.; Haugegaard, S.; Angen, Ø.; Jorsal, S.E.; Kokotovic, B.; Larsen, L.E.; Jensen, T.K.; Nielsen, J.P. (2013): Ny Neonatal Diarré – Patologi og mikrobiologi i 4 besætninger. Meddelelse nr. 1005, Videncenter for Svineproduktion.
[3]	Kongsted H. (2015): Spædgrisediarré - risikofaktorer, forebyggelse og behandling. Meddelelse nr. 1048, Videncenter for Svineproduktion.
[4]	Asten, A. J. A. M. van; Nikolaou, G.N.; Grone, A. (2010): The occurrence of cpb2-toxigenic <i>Clostridium perfringens</i> and the possible role of the beta 2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. Veterinary Journal, 183: 2, pp. 135-140.
[5]	Jonach, B.; Boye, M.; Stockmarr, A.; Jensen, T. (2014): Fluorescence <i>in situ</i> hybridization investigation of potentially pathogenic bacteria involved in neonatal porcine diarrhea. BMC Veterinary Research, 10(1):68.
[6]	Larsson, J.; Lindberg, R.; Aspan, A.; Grandon, R.; Westergren, E.; Jacobson, M. (2014): Neonatal piglet diarrhoea associated with enteroadherent <i>Enterococcus hirae</i> . Journal of Comparative Pathology, 151(2-3), pp. 137-147.
[7]	Silva, R.O.S.; Guedes, R.M.; Lobato, F.C.F. (2013): <i>Clostridium difficile</i> infection: Main features and occurrence in domestic species in brazil. Ciencia Rural, 43: 1, pp. 73-80.

[8]	Chan, G.; Farzan, A.; DeLay, J.; McEwen, B.; Prescott, J.F.; Friendship, R.M. (2013): A retrospective study on the etiological diagnoses of diarrhea in neonatal piglets in Ontario, Canada, between 2001 and 2010. Canadian Journal of Veterinary Research, 77(4): pp. 254-260.
[9]	Brown, C.C.; Baker, D.C.; Baker, I.K. (2007): Alimentary system. In: Grant Maxie, M. (editor): Pathology of domestic animals. Vol 2. 5th. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp. 1-296.
[10]	Weber, N.; Nielsen, J.P.; Jakobsen, A.S.; Pedersen, L.L.; Hansen, C.F.; Pedersen, K.S. (2015): Occurrence of diarrhoea and intestinal pathogens in non-medicated nursery pigs. Acta Veterinaria Scandinavica, 57:64.

Deltagere

Lars Erik Larsen, og Branko Kokotovic, DTU Veterinærinstituttet.

Ken Steen Pedersen, Svend Haugegaard, Charlotte Salomonsen, og Birgitta Svensmark, SEGES Svineproduktion.

Aktivitetensnr.: 053-400990

HTF Journalnr.: 3412-09-02519

//CSK//



Tlf.: 33 39 45 00

svineproduktion@seg.es.dk

Ophavsretten tilhører SEGES. Informationerne fra denne hjemmeside må anvendes i anden sammenhæng med kildeangivelse.

Ansvar: Informationerne på denne side er af generel karakter og søger ikke at løse individuelle eller konkrete rådgivningsbehov.

SEGES er således i intet tilfælde ansvarlig for tab, direkte såvel som indirekte, som brugere måtte lide ved at anvende de indlagte informationer.