



Videncenter for  
Svineproduktion

# NY NEONATAL DIARRÉ – PATOLOGI OG MIKROBIOLOGI I 4 BESÆTNINGER

MEDDELELSE NR. 1005

Grise fra fire besætninger med diarré i første leveuge er undersøgt laboratiemæssigt. Meddelelsen fokuserer på, hvilke obduktionsfund der er karakteristiske for Ny Neonatal Diarré og på, om der kan påvises infektiøse årsager til syndromet.

---

INSTITUTION: VIDENCENTER FOR SVINEPRODUKTION

FORFATTERE: **HANNE KONGSTED**  
**POUL BÆKBO**  
BEATA JONACH, VETERINÆRINSTITUTTET, DTU  
SVEN ERIK JORSAL, VETERINÆRINSTITUTTET, DTU  
ØYSTEIN ANGEN, VETERINÆRINSTITUTTET, DTU  
LARS ERIK LARSEN, VETERINÆRINSTITUTTET, DTU  
BRANKO KOKOTOVIC, VETERINÆRINSTITUTTET, DTU  
TIM KAARE JENSEN, KØBENHAVNS UNIVERSITET  
JENS PETER NIELSEN, KØBENHAVNS UNIVERSITET

UDGIVET: 26. JUNI 2014

Dyregruppe: Pattegrise

Fagområde: Sundhed og sygdom

# Sammendrag

I alt 101 aflivede grise fra 4 besætninger udvalgt pga. store problemer med diarre inden for den første leveuge, dannede grundlaget for en undersøgelse af obduktionsforandringer og forekomst af smitstoffer. Det gennemgående obduktionsfund var slappe, let udspilede tarme. Kun sjældent sås mere specifikke forandringer som reaktion i lymfeknuder og i slimhinden. Alle de undersøgte diarré-grise havde fyldte maver ved obduktion, og diarréen var således ikke sultrelateret.

Mikrobiologisk fandt vi en omvendt sammenhæng mellem forekomst af bakterien *Clostridium perfringens* type A og diarré, sådan at markant flere raske grise havde denne bakterie i tarmen. En anden bakterie, *Clostridium difficile* blev kun påvist i 2 af de undersøgte grise, og må umiddelbart anses som uvæsentlig for syndromet. Coronavirus, som i andre lande volder store diarréproblemer (i form af Porcin Epidemisk Diarré (PED)/ Transmisibel Gastroenteritis (TGE)) blev ikke påvist.

I den ene besætning havde diarréen sammenhæng med en høj forekomst af *E. coli* bakterier med et særligt gen for toxin-produktion (EAST-1) samt bakterien *Enterococcus hirae*. I de andre besætninger sås ingen specifik sammenhæng med smitstoffer, men der blev påvist enkelte virustyper (kobuvirus, teschovirus og rotavirus C) som måske kan have betydning.

## Baggrund

Neonatal diarré (diarré inden for den første leveuge) er – i større eller mindre omfang - velkendt i de fleste svinebesætninger. Omkring 2008 begyndte mange danske besætninger dog at rapportere om et nyt diarrésyndrom som ikke responderede på almindelige management tiltag eller antibiotika. Siden da, har flere forskellige lande rapporteret om lignende problemer (Gin et al., 2010; Melin et al., 2010; Wallgren et al., 2012). Fælles for de rapporterede tilfælde er, at traditionelle laboratorieundersøgelser ikke giver nogen forklaring på problemerne.

Traditioner omkring laboratorieundersøgelser varierer fra land til land, men overordnet set er det følgende smitstoffer, man har undersøgt for i forbindelse med neonatal diarré; Enterotoxigene *Escherichia coli* (ETEC), *Clostridium perfringens* type A (CPA), *Clostridium perfringens* type C (CPC), *Clostridium difficile* (CD) rotavirus gruppe A (RVA) og coronavirus (Svensmark, 2009; Yaeger et al., 2002). Parasitter, der kan være relevante at undersøge er; *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Isospora* og *Strongyloides* (MaddoxHyttel et al., 2006; Meyer et al., 1999; Vitovec and Koudela, 1992).

Det overordnede formål med studiet var at undersøge om en detaljeret mikrobiologisk undersøgelse af et stort antal grise fra udvalgte problembesætninger ville påvise en infektiøs årsag til problemet. Den mikrobiologiske undersøgelse omfattede dyrkning af bakterier, påvisning af bakterier ved mikroskopiske undersøgelser, virulens-faktor undersøgelser af *E. coli* bakterier, mikroskopisk

undersøgelse for parasitter, undersøgelser af toksiner produceret af *Clostridium perfringens* og en række forskellige specifikke og overordnede undersøgelser for virus.

Samtidig skulle studiet vise om grise fra forskellige problembesætninger havde fælles og gennemgående karakteristika, som kunne bruges i en definition af syndromet.

## Materiale og metode

### Studie design

Studiet var et Case-Kontrol studie udført på 101 aflivede grise fra 4 danske produktionsbesætninger i løbet af 2011. I alt 989 grise blev evalueret klinisk dagligt fra fødsel til dag 5-7 og grise til obduktion blev aflivet på udvalgte tidspunkter i sygdomsforløbet.

### Inklusion af besætninger

Besætninger med diarréproblemer blev anbefalet af deres praktiserende dyrlæger og inkluderet i studiet efter følgende kriterier: 1) Diarré inden for den første leveuge med dårlig respons på antibiotika skulle have været til stede i minimum 30 % af kuld i mindst 6 måneder, 2) Besætningen skulle foretage rutinevaccination mod *E. coli* diarré og klassisk tarmbrand (*Clostridium perfringens* (Cp) type C), 3) Besætningen skulle have forsøgt en række forebyggende tiltag uden effekt, 4) Besætningen måtte ikke have en aktiv PRRS infektion i farestalden (testet ved blodprøver af grise) og 5) I 5 aflivede 1-4 dage gamle grise måtte ikke kunne påvises en klassisk årsag til diarré (*E. coli*, Cp type C eller RVA).

I alt fire besætninger indgik i undersøgelsen. Besætningerne var alle veldrevne med gode stalde og fornuftigt nærmiljø. Der blev praktiseret alt-ind alt-ud med grundig rengøring og desinfektion mellem hold. Farestier var indrettet med delvist spaltegulv. Grisehulerne var overdækkede, havde varmelamper og isolerende måtter eller varme indlagt i gulvet i grisehulen.

Alle besætninger havde haft problemer med diarré i mindst et år. Af præventive management-tiltag, som havde været forsøgt uden held kan nævnes; ændringer i sofoder, optimeret hygiejne, gødnings-immunisering og vaccination mod CPA og Porcint Circovirus 2. Alle besætninger havde forsøgt flere forskellige typer antibiotika og flere forskellige behandlingsstrategier uden stor effekt. Alle besætninger behandlede med toltrazuril på dag 3 eller 4 for at forebygge coccidiose. Kastration af hangrise og jerninjektioner blev givet sammen med toltrazuril-behandlingen. Besætningsdata er vist i Tabel 1.

**Tabel 1.** Data for de fire undersøgelsesbesætninger

	Besætning 1	Besætning 2	Besætning 3	Besætning 4
Undersøgelsesperiode	januar 2011	marts 2011	maj 2011	juli 2011
Antal søer	900	1250	700	950
SPF-status	Ingen	Ingen	SPF + Ap12	SPF
Fravænnede grise/årso <sup>#</sup>	30,7	27,1	25,4	32,3
Gylte% <sup>#</sup>	20	22	21	23
Polterekruttering	Indkøb	Egenproduktion	Indkøb	Egenproduktion
Sæd	Ekstern KS	Intern KS	Intern KS	Ekstern KS
Sofoder I farestald	Hjemmeblander Rest-løs vådfodring	Hjemmeblander Rest-løs vådfodring	Hjemmeblander Rest-løs vådfodring	Indkøbt foder vådfodring
Rutinebehandlinger grise <sup>§</sup>	Ingen	Ingen	Amoxicillin ved fødsel	Amoxicillin ved kastration
Rutinebehandlinger søer <sup>¶</sup>	Ingen	Ingen	Oxytocin efter farring	Oxytocin efter farring

<sup>#</sup>: Gennemsnit fra E-kontrol de sidste 3 måneder før undersøgelses-perioden. <sup>§</sup>: Standardbehandlinger udført i grisenes første leveuge. I øvrigt blev alle grise behandlet med smertestillende middel (NSAID) ved kastration. I undersøgelsesperioden blev der ikke udført rutinebehandlinger af grise med antibiotika. <sup>¶</sup>: Standardbehandlinger udført omkring farring. Disse behandlinger blev også gennemført i undersøgelses-perioden.

## Inklusion af søer og grise

I hver besætning blev ca. 20 søer fra det samme færehold og i den samme farestald udvalgt på farings-dagen (dag 1). Udvælgelsesproceduren tog sigte på især at inkludere første-lægs kuld (med formodet størst risiko for diarré), 11-12 grise (alle over 800g) pr kuld blev tilfældigt udvalgt ved fødsel og øremærket. Overskydende grise i kuldene blev flyttet efter max 16 timer. Alle grise i undersøgelsen blev hos deres egen mor gennem hele undersøgelsen.

Søer og grise blev undersøgt dagligt fra dag 1 til 5-7 (antallet af dage varierede i forhold til besætningens normale oplevelse af problemets tidsforløb). Den daglige bedømmelse af gødningskonsistens blev gennemført ved hjælp af rektalsvabre. Grisen blev bedømt til at have diarré, hvis konsistensen af gødning var tynd eller vandig. Cremet, fast og knoldet gødning, samt hvis der ikke var noget gødning at se på rektalsvaberen, blev bedømt som normalt.

## Udvælgelse af Case- og Kontrol grise

Alders-matched Case- (syge) og Kontrol (raske) grise blev udvalgt til obduktion på to forskellige tidspunkter i sygdomsforløbet. De eksakte tidspunkter blev individuelt bestemt i hver besætning under hensyntagen til besætningens normale oplevelse af problemerne. I besætninger, der normalt oplevede diarré fra 2. levedøgn, blev grisene aflivet på dag 3 og 5. I besætninger, der normalt oplevede diarré

fra 3. levedøgn, blev grisene aflivet på dag 4 og 6. Da de 4 besætninger oplevede diarré fra dag 2, 3 eller 4, var de udvalgte grise fra 3-7 dage gamle.

Udvælgelseskriterier for Case-grise: Diarré (tynd eller vandig gødning) i mindst 2 på hinanden følgende dage inklusiv dage for udvælgelse. Case-grise blev udvalgt fra kuld med den højeste diarréforekomst på dagen.

Udvælgelseskriterier for Kontrol-grise: Normal gødning på alle dage forud for udvælgelse. Kontrol-grise blev udvalgt fra kuld med den laveste forekomst af diarré eller ingen diarré på dagen.

Case- og Kontrol grise måtte ikke udvælges fra samme kuld (selvom et kuld kunne skifte diarréstatus fra den ene aflivningsdag til den næste).

Ingen af de tidligst aflivede (3-5 dage gamle, afhængigt af besætning) var behandlet med antibiotika.

Alle Case-grise, der blev aflivet sent i forløbet (5-7 dage gamle, afhængigt af besætning) var blevet behandlet med antibiotika ifølge besætningernes normale rutiner.

## Diagnostiske undersøgelser

### Obduktion

Grisene blev transporteret levende til laboratoriet og aflivet inden for 6 timer efter udvælgelse i besætningen. Tarmvæv til histologisk undersøgelse blev udtaget straks efter aflivning og fixeret i formalin. Vævsprøver og tarmindehold til virologiske undersøgelser og *Cp* toxin-undersøgelse blev udtaget straks efter aflivning og snap-frosset på tøris og herefter opbevaret ved -80 °C.

Alle organer blev rutinemæssigt undersøgt for makroskopiske forandringer.

### Mikroskopisk undersøgelse af læsioner

Undersøgelsen blev udført på vævsprøver fra forskellige afsnit af tarmen (duodenum, jejunum, ileum og colon). De fixerede tarmstykker blev indstøbt i formalin, farvet med HE-farvning og undersøgt i lys mikroskop. Tyndtarmslæsioner blev registreret, hvis et eller flere afsnit af tyndtarmen (duodenum, jejunum eller ileum) havde læsioner.

### Mikrobiologiske undersøgelser

#### Påvisning af bakterier ved dyrkning

*E. coli* bakterier blev påvist ved aerob dyrkning fra tynd- og tyktarm. *Clostridium perfringens* (CP) og *Clostridium difficile* (C. difficile) blev påvist ved anaerob dyrkning fra tynd- og tyktarm.

En gris blev anset som *E. coli* positiv, hvis der blev påvist hæmolytiske *E. coli* kolonier (enhver forekomst) eller hvis der blev påvist moderat til massiv forekomst af non-hæmolytiske *E. coli* kolonier i enten tynd- eller tyktarm. For hver *E. coli* positiv gris blev ét bakterie isolat karakteriseret ved O-typning og virulens-faktor bestemmelse ved Polymerase Chain Reaction (PCR) (Zhang et al., 2007). Tabel 2 viser en oversigt over de O-typer og virulensgener, som blev undersøgt.

**Tabel 2.** *E. coli* O-grupper, adhesion-gener og toxin-gener undersøgt i studiet.

O-grupper	O8, O45, O64, O138, O139, O141, O149, O157
Adhesin*-gener	F4, F5, F6, F18, F41, intimin, Paa, AIDA-1
Toxin-gener	STa, STb, LT, VT2e, EAST-1

\*: Samle-betegnelse for faktorer der giver bakterien en evne til at fasthæfte til slimhinden.

En gris blev anset som CP positiv, hvis der blev påvist moderat til massiv forekomst af *Cp* kolonier i enten tynd- eller tyktarm. Typning af CP blev foretaget på en pool af fire isolater efter metoder beskrevet af Baums et al., 2004.

En gris blev anset som *C. difficile* positiv, hvis der blev påvist *C. difficile* kolonier (enhver forekomst) i enten tynd- eller tyktarm.

### Påvisning af bakterier ved mikroskopi

*E. coli*, *C. perfringens*, *C. difficile* og *Enterococcus spp.* blev påvist ved hjælp af Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Fordelen ved denne undersøgelse er, at man både kan se om bakterierne er tilstede, og se hvor i tarmen de ligger. Mange bakterier vil, hvis de giver anledning til sygdom, kunne ses liggende tæt op ad slimhinden (evt. fasthæftet til slimhinden). Bakterier, der bare er til stede som en del af den normale tarmflora, vil derimod som regel ligge inde i midten af tarmen og i tarmindholdet.

### Påvisning af clostridie-toxiner

Tilstedeværelse af beta2-toxin i tyndtarmindholdet blev undersøgt ved Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

### Påvisning af virus

De specifikke virusarter, som blev undersøgt i studiet var: Rotavirus A, rotavirus C, coronavirus (TGE-virus og PEDvirus), astrovirus, sapovirus, enterovirus, parechovirus, saffoldvirus, cosavirus, aichivirus og klassevirus. Samtlige 101 grise blev undersøgt for rotavirus A og coronavirus. Alle grise fra besætning 1-3 blev undersøgt for rotavirus C, TGEvirus, PEDvirus, astrovirus og sapovirus. De øvrige virus blev undersøgt på udvalgte grise fra besætning 1-3.

Der blev også lavet en del overordnede virus-undersøgelser i studiet. Pga. prisen blev disse undersøgelser imidlertid begrænset til et mindre antal prøver – udvalgt fra grise med mikroskopiske tegn på evt. virusbetinget diarré fra alle fire besætninger. De overordnede undersøgelser bestod af:

Påvisning af viruspartikler ved elektron mikroskopi, undersøgelser vha. Microarrays (gen-baserede metoder, rettet mod overordnede virus-familie gener) og de novo Next Generation Sequencing (gen-sekventering, der fuldstændigt kan kortlægge hvilke virus-gener, der findes i en prøve).

### Påvisning af parasitter

Forekomst af parasitterne *Cryptosporidium spp*, *Giardia spp*, *Cystoisospora suis* (tidl: *Isospora suis* (coccidier)) og *Strongyloides ransomi* (trådorm) blev undersøgt på histologiske snit.

### Statistik

Sammenhænge mellem diarréstatus og mikrobiologiske og patologiske fund blev evalueret på tværs af besætninger vha. Fisher's exact tests ( $\alpha=0.05$ ). Unikke besætningsfund eller besætningsafvigelser blev påpeget deskriptivt eller beregnet ved samme metode (der var ofte for få data i de enkelte besætninger til at statistiske beregninger gav mening).

## Resultater og diskussion

### Grise i studiet

I alt 51 diarré-grise (11-14 pr besætning) og 50 kontrolgrise (12-13 pr besætning) i alderen 3-7 dage var med i undersøgelsen. Klinisk set, var diarréen gullig og uden nogen form for til-blanding. Da varigheden af symptomer i besætningerne generelt var kort, havde langt de fleste (80 %) af de udvalgte diarrégrise haft diarré i 2-3 dage før aflivning. I alt 7 (14 %) af de aflivede diarrégrise havde haft diarré i 4 dage før aflivning og kun 3 (6 %) havde haft diarré i 5 dage.

### Mikrobiologiske undersøgelser

#### Bakterier

Tabel 3 viser forekomsten af bakterier i Case- og Kontrol grise på tværs af besætninger. For de bakterier, der både er påvist ved dyrkning og mikroskopi (*E. coli*, *C. perfringens* og *C. difficile*) er kun dyrkningsresultaterne taget med i tabellen.

**Tabel 3.** Bakterier påvist ved dyrkning eller FISH i Case- og Kontrol-grise. Fund med signifikant forskellig forekomst hos Case- og Kontrolgrise er markeret med **fed**.

Bakterie	Case-grise N=51		Kontrol-grise N=50	
	n	%	n	%
Hæmolytiske <i>E. coli</i> ikke-typbare <sup>§</sup>	3	6	0	0
Non-hæmolytiske <i>E. coli</i> ikke-typbare <sup>§</sup>	24	47	24	48
Non-hæmolytiske <i>E. coli</i> spontant-agglutinerende <sup>‡</sup>	2	4	1	2
Non-hæmolytiske <i>E. coli</i> serotype O8	2	4	3	6
Non-hæmolytiske <i>E. coli</i> serotype O157*	4	8	0	0
<b><i>C. perfringens</i> type A (CPA)</b>	<b>18</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>70</b>
<i>C. perfringens</i> type C <sup>#</sup> (CPC)	3	6	1	2
<i>C. difficile</i>	0	0	2	4
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>	<b>25</b>	<b>49</b>	<b>4</b>	<b>8</b>

§: Henviser til, at isolaterne ikke tilhørte nogen af de testede O-grupper. ‡: Henviser til at isolaterne reagerede med alle de testede O-grupper. \*: Alle fire isolater blev påvist i samme besætning (Bes 3). #: *C. perfringens* type C blev påvist i 2 besætninger (Bes 1 og 4).

Som det fremgår af tabellen, blev CPA påvist i signifikant flere raske grise end i grise med diarré.

Tendensen til at Kontrol-grise havde en højere forekomst af CPA var den samme inden for besætning 1, 2 og 3. I disse besætninger var 3 (23 %), 2 (18 %) og 4 (29 %) af Case-grisene positive, sammenlignet med 8 (62 %), 6 (50 %) og 12 (92 %) af Kontrol-grisene. I besætning 4 var forekomsten af CPA den samme blandt Case- og Kontrolgrise (9 positive grise i begge grupper).

Fundene af CPC (klassisk tarmbrand) kom som en ret stor overraskelse, da det er en bakterie, der efterhånden meget sjældent påvises ved rutineundersøgelser (og som alle de inkluderede besætninger jo også vaccinerede imod). Interessant nok, blev denne bakterie påvist i 2 klinisk meget forskellige besætninger – Besætning 1 med alvorlig diarré med høj dødelighed og Besætning 4, som havde en ret lav forekomst af diarré uden markant dødelighed. I de to besætninger, hvor CPC blev påvist, blev der efterfølgende iværksat serumbehandling mod bakterien. Besætning 1 oplevede ingen bedring af symptomer i forbindelse med serumbehandling. Besætning 4 oplevede, at problemerne stort set forsvandt (denne besætning havde dog også i undersøgelsesperioden en markant lavere forekomst af diarré – og var efter alt at dømme allerede i bedring på dette tidspunkt).

Forekomsten af *Enterococcus spp.* var højere blandt Case- end blandt Kontrol-grise i besætning 1, 2 og 3. I disse besætninger var 7 (54 %), 9 (82 %) og 6 (43 %) af Case-grisene vs. 1 (8 %), 0 (0 %) og 0 (0 %) af Kontrol-grisene positive. I besætning 4 blev der påvist enterokokker lige så hyppigt blandt



Case-grise som blandt Kontrol-grise (3 positive i hver gruppe). Enterokokkerne blev hyppigst påvist i tarmindholdet men især i besætning 2 blev der påvist en del enterokokker, der klæbede til slimhinden.

I denne besætning var der fast-klæbende enterokokker i 8 (73 %) af Case-grise mens der ikke blev påvist nogen fastklæbende enterokokker i Kontrol-grise.

Non-hæmolytiske *E. coli* var et meget hyppigt fund i både Case- og Kontrolgrise. Forekomsten af hæmolytiske *E. coli* stammer var derimod, som ventet, lav. I alt 59 *E. coli* isolater blev testet for alle de nævnte virulens-gener. Resultatet af disse undersøgelser er vist i Tabel 4.

**Tabel 4.** Summarisk oversigt over forekomst af virulens-gener i 31 isolater fra Case-grise og 28 isolater fra Kontrol-grise.

	n	Ingen faktorer påvist	Kun Adhesin*	ST**/ LT <sup>¶</sup> / VT2e <sup>#</sup> uden adhesin	EAST-1 <sup>£</sup> med eller uden adhesin	Fimbrie <sup>§</sup> + VT2e
Case-isolater	31	7	5	4	15**	0
Kontrol-isolater	28	13	3	4	5	3

\*: Betegnelsen "Adhesin" henviser til et eller flere af følgende: F4, F5, F6, F18, F41, AIDA-1 eller intimin. \*\*: Heat-Stable toxin a eller b. ¶: Heat-labile toxin. #: Verotoxin 2e. £: Enteroaggregative *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin-1. §: Disse 3 isolater bar henholdsvis fimbrie-gen F4, F5 og F18. \*\*: Ét af disse isolater indeholdt både EAST-1, STa og F18.

Kun ét af de påviste isolater (fra en diarrégris) kan betegnes som et "klassisk enterotoxigent *E. coli* isolat" (den type af *E. coli* som man normalt forbinder med diarré hos grise).

EAST-1 genet var det hyppigst forekommende toxin-gen. I alt var 15 (48 %) af Case-isolater og 5 (18%) af Kontrol-isolater EAST-1 positive. Dog var der mange EAST-1 positive isolater uden adhesin-gener. Især Besætning 2 havde mange EAST-1 positive isolater. I denne besætning havde 10 ud af 10 Case-isolater og 1 ud af 6 Kontrol-isolater genet for EAST-1.

Ved den mikroskopiske undersøgelse af *E. coli* forekomsten var det markant at bakterierne i Besætning 2 viste sig at have en tendens til at klæbe til slimhinden, hvorimod *E. coli* bakterierne i de andre besætninger hyppigere var placeret inde i tarmindholdet.

Som Tabel 3 viser, var kun 2 grise positive for *C. difficile* ved dyrkning. Ved den mikroskopiske undersøgelse blev der i ca. 70 % af alle grise – uafhængigt af diarréstatus - påvist *C. difficile* i ganske små mængder i tyktarmens indhold. Ingen af disse bakterier klæbede til slimhinden.

## Clostridie-toxiner

I alt 95 grises tyndtarmsindhold blev testet for indhold af beta2-toxin. Resultaterne fremgår af Tabel 5.

**Tabel 5.** Antal (%) grise der var positive i ELISA test for beta2-toxin i hver af de 4 besætninger.

	Besætning 1		Besætning 2		Besætning 3		Besætning 4	
	Case	Kontrol	Case	Kontrol	Case	Kontrol	Case	Kontrol
Antal undersøgte grise	12	13	9	12	11	13	13	12
Beta2-toxin påvist	6 (50%)	7 (54%)	5 (56%)	5 (42%)	6 (55%)	6 (46%)	9 (69%)	5 (42%)

Der var ingen statistisk sikker forskel på toxin-indhold i Case og Kontrolgrise.

## Virus

De specifikke undersøgelser viste at forekomsten af RVA var meget lav (i alt 9 % positive) og ikke forbundet med diarré. Ingen af de undersøgte grise var positive for rotavirus C, coronavirus, astrovirus, sapovirus, enterovirus, parechovirus, saffoldvirus, cosavirus, aichivirus eller klassevirus.

Der blev ikke påvist viruspartikler ved elektron-mikroskopi eller ved micro-array.

Ved de novo Next Generation Sequencing blev påvist kobuvirus i alle besætninger samt hhv. rotavirus C i besætning 1 og teschovirus i besætning 3. Disse analyser blev kun foretaget på udvalgt materiale fra Case-grise, så om der er en årsagssammenhæng er uvist.

## Parasitter

Der blev ikke påvist parasitter i hverken Case- eller kontrolgrise i studiet.

## Hvad betyder de mikrobiologiske fund?

En høj forekomst af ikke-typbare non-hæmolytiske *E. coli* i begge grupper af grise var forventelig, da disse bakterier er en del af den normale tarmflora. De enkelte klassiske sygdomsfremkaldende typer af bakterier, der blev påvist - en ødemsyge-type (F18+VT2e) og en diarré-type (F18, STa, EAST-1) - må betegnes som tilfældige fund, da sygdomsvoldende *E. coli* ville have været til stede i større omfang.

*E. coli* med toxin-genet EAST-1 er i de senere år i flere tilfælde blevet påvist hos pattegrise med diarré, og er hyppigt set hos kendte diarréfremkaldende *E. coli* bakterier (Choi ChangSun et al., 2001; Vu-Khac et al., 2007; Zajacova et al., 2012). Om EAST-1 bakterier uden adhesin-gener (=uden evne til at hæfte sig til slimhinden) i sig selv er sygdomsfremkaldende er uvist. I dette studie, hvor vi i samme besætning (Besætning 2) påviste *E. coli* bakterier, der klæbede til slimhinden og *E. coli* bakterier, der kun indeholdt (eller i hvert fald kun fik påvist) EAST-1 genet, bliver spørgsmålet endnu

mere interessant. I dette tilfælde ser det jo ud til, at bakterierne faktisk var i stand til at klæbe til slimhinden.

Den høje forekomst af *Cp* type A og associationen til raske grise i studiet skal formentlig tolkes sådan, at den naturlige tarmflora (som *Cp* type A er en del af) er intakt i de raske grise. I litteraturen er der uenighed om hvorvidt *Cp* type A er sygdomsfremkaldende. Mange studier bygger på den fejlagtige antagelse, at fordi man påviser *Cp* type A i grise med diarré, så har grisene diarré pga. *Cp* type A.

Traditionelt har kun få studier undersøgt og sammenlignet forekomsten i grise med og uden diarré.

Siden 2003 er der foretaget 3 større studier, der involverede begge typer af grise. Studierne byggede på påvisning af genet for beta-2 toxin, som hyppigt findes hos *CpA*, ved PCR. Ingen af studierne påviste en forskel på forekomsten af beta-2 toxin gener i pattegrise med og uden diarre – 80-90 % var positive i begge grupper (Bueschel et al., 2003; Cruz Jr et al., 2013; Farzan et al., 2013). Metoden vi brugte til direkte at påvise indhold af beta2-toxin i tarmindehold har kun været anvendt i et enkelt internationalt studie (Farzan et al., 2013). Her fandt man samme resultat som i dette studie – at der ikke var forskel på toxin-indhold hos grise med og uden diarré.

Den lave forekomst af *C. difficile* indikerer, at denne bakterie ikke er betydende for diarréen i de fire besætninger. Besværligheder med dyrkning, som ellers kan være forklaring på en lav påvisningsgrad, blev imødegået ved også at undersøge vævet mikroskopisk. På samme måde må påvisningerne af *Cp* type C i studiet nok tolkes som interessante tilfældighedsfund, snarere end fund, der generelt kan kobles til syndromet.

Påvisningen af *Enterococcus hirae*, som især var fremtrædende i Besætning 2, der samtidigt havde en høj forekomst af EAST-1 positive *E. coli* bakterier er interessant, fordi et samspil mellem de to bakterier måske kunne forklare sygdomsudbruddet. *Enterococcus spp* tilhører gruppen af mælkesyrebakterier, som er en del af den normale tarmflora og som er blevet anvendt som probiotikum (Fisher and Phillips, 2009). Traditionelt har man således anset denne gruppe af bakterier som gavnlige for tarmfunktionen. En nylig svensk undersøgelse har imidlertid forbundet påvisning af *Enterococcus spp* med forekomst af diarré hos neonatale grise (Larsson et al., 2013). Så måske er der en sammenhæng (måske lokalt i visse besætninger).

I forhold til de mere utraditionelle parasit- og virusundersøgelser, der blev udført i studiet kunne vi konstatere, at ingen af dem kunne forklare diarréen. TGEV og PEDV som i andre lande volder voldsomme problemer, lader det fortsat ikke til, at vi har herhjemme (ved nyintroduktion af sådan smitte til landet ville man også forvente en massiv dødelighed, som vi generelt ikke har oplevet ved de nuværende problemer). Rotavirus C, som der i udlandet spekuleres en del i i forbindelse med neonatal diarré, blev heller ikke påvist som årsag til problemerne her. Hvorvidt kobuvirus og teschovirus evt. kan have en betydning skal afklares yderligere – men studier fra andre lande tyder på

at disse virus nok skal betragtes som en del af den normale tarmflora (Park et al., 2010; Shan et al., 2011).

## Obduktion

Obduktionsfund på tværs af besætninger er præsenteret i Tabel 5.

**Tabel 5.** Obduktionsfund i Case- og Kontrolgrise fra de fire besætninger. Fund med signifikant forskellig (Fisher's exact test,  $\alpha=0,05$ ) forekomst hos de to grupper af grise er markeret med **fed**.

Obduktionsfund	Case-grise n=51	Kontrolgrise n=50
Generelle fund		
<b>Afmagring</b>	<b>29 (57 %)</b>	<b>2 (4 %)</b>
<b>Dehydrering</b>	<b>15 (29 %)</b>	<b>1 (2 %)</b>
Tom mavesæk	0 (0 %)	6 (12 %)
Tyndtarm		
<b>Atoni/ slaphed</b>	<b>37 (73 %)</b>	<b>10 (20 %)</b>
Rødme	3 (6 %)	0 (0 %)
Stribninger	1 (2 %)	0 (0 %)
Ødem i tarmkrøs	2 (4 %)	2 (4 %)
Store lymfeknuder	9 (18 %)	8 (16 %)
Mathed/ nekrose af slimhinde	4 (8 %)	4 (8 %)
<b>Vandigt indhold</b>	<b>29 (57 %)</b>	<b>15 (30 %)</b>
Tyktarm		
<b>Atoni/ slaphed</b>	<b>27 (53 %)</b>	<b>3 (6 %)</b>
Ødem i tarmkrøs	20 (39 %)	10 (20 %)
Store lymfeknuder	2 (4 %)	1 (2 %)
<b>Vandigt indhold</b>	<b>24 (48%)</b>	<b>5 (10 %)</b>

Der blev kun påvist ganske få forandringer uden for tarmen. Det eneste af disse fund, der blev påvist i mere end én gris var en bleg og gullig lever, som blev påvist i 5 Case-grise og en enkelt Kontrol-gris.

De seks obduktionsfund, som var mere udbredte hos grise med diarré end hos grise uden diarré (afmagring, dehydrering, slaphed af tyndtarm, vandigt indhold i tyndtarm, slaphed af tyktarm og

vandigt indhold i tyktarm) var ikke lige udbredte og havde ikke samme association til diarré inden for alle besætninger. De væsentligste forskelle var:

- Besætning 2 havde ingen dehydrerede grise ved obduktion.
- Slaphed af tarme var mindre udbredt i Case-grise fra besætning 4, hvorimod mange Kontrol-grise fra denne besætning havde dette fund.
- Vandigt indhold i tyndtarmen var mest udbredt blandt Kontrol-grise i besætning 4 og lige udbredt blandt Case- og kontrolgrise i besætning 3.

Forandringer, som traditionelt forbindes med klassisk tarmbrand forårsaget af CPC (stribning af tarmoverflade, mathed/ vævsdød i slimhinden) blev hovedsageligt påvist i grise fra Besætning 1 og 4, men ikke i de samme grise, som fik påvist CPC ved dyrkning.

### Mikroskopiske læsioner

Overordnet set, blev atrofi af tarm-villi påvist i 63 % af Case-grise og 12 % af kontrol-grise. Graden af atrofi varierede en del, uden nogen tydelig forbindelse til diarréstatus. Tabel 6 viser de mikroskopiske fund på tværs af besætninger.

**Tabel 6.** Mikroskopiske læsioner i Case- og Kontrolgrise fra de fire besætninger

Mikroskopiske fund*	Case-grise n=51 (49 blev undersøgt i tyktarmen)	Kontrol-grise n=50 (46 blev undersøgt i tyktarmen)
Tyndtarm		
Svind af tarmtrævler	<b>32 (63 %)</b>	<b>6 (12 %)</b>
Betændelsesceller i tarmvæg	17 (33 %)	16 (32 %)
Slimhinde skader	<b>10 (20 %)</b>	<b>3 (6 %)</b>
Slimhinde vævsdød	3 (6 %)	0 (0 %)
Tyktarm		
Slimhinde skader	<b>16 (33 %)</b>	<b>5 (11 %)</b>
Slimhinde vævsdød	1 (2 %)	0 (0 %)

\*: Benævnelserne betyder groft sagt: "Atrofi af villi": Afkortning af tarmtrævler, "Neutrofil infiltration": Mange betændelsesceller i vævet, "Slimhinde læsioner": Mindre forandringer i slimhindens overflade, hvor overfladen stadig er intakt, "Slimhinde nekrose": Voldsomme slimhindeforandringer med vævsdød.

Svind af tarmtrævler blev påvist i alle besætninger, og i besætning 1-3 var der en sammenhæng mellem diarré og dette fund. I besætning 4 havde lige mange (ca. 35 %) af grisene i de to grupper atrofi af tarm-villi.

Vævsdød i slimhinden blev kun påvist i to af besætningerne (Besætning 1 og 4), og kunne formodes at have forbindelse med Cp type C, som jo netop blev påvist i disse besætninger. Nekrosen blev dog kun i ét tilfælde konstateret hos en gris, som ved bakteriologisk undersøgelse havde fået påvist Cp type C. I læsionen blev der histologisk påvist både *C. perfringens* og *Fusobacterium necroforum*. I de

to øvrige tilfælde blev der histologisk påvist hhv. *Fusobacterium necroforum* og ingen bakterier i læsionerne. Betydningen af *Fusobacterium necroforum* i forbindelse med diarré hos grise er kun sparsomt undersøgt, men der er i Danmark påvist tilfælde af diarré hos fravænnede grise, som kunne tilskrives infektion med denne bakterie (*Fusobacterium necroforum* blev påvist i læsionerne ved mikroskopisk undersøgelse og ingen andre patogener blev påvist) (Jensen et al., 2008).

### Hvad betyder fundene?

Det var interessant, at alle de obducerede diarré-grise i studiet havde mælkefyldte mavesække. Neonatal diarré ses i praksis ofte som følge af sult (tarmtrævlerne degenererer, hvis de ikke tilføres næring, og derfor kan de ikke effektivt absorbere væske fra tarmen). De fyldte mavesække adskiller således diarré-grisene fra dette studie fra tilfælde af neonatal diarré, hvor den egentlige årsag er sult.

Dog skal man være opmærksom på at langt størstedelen (80 %) af de undersøgte grise kun havde haft diarré i 2 eller 3 dage i alt. Studiet giver derfor ikke nogen information om, hvordan mavesækkenes fyldning ser ud efter længerevarende episoder med diarré. Logisk set vil man forvente, at grise der har lidt af diarré gennem længere tid mister kræfterne til at die, og derfor vil have tomme mavesække ved obduktion. Fundet understreger vigtigheden af at obducere grise tidligt i sygdomsforløbet, så man kan få et indtryk af, om det var sult, der startede problemerne.

Slaphed var det mest fremtrædende obduktionsfund i tarmene. Man ser atoni af tarme i forbindelse med flere forskellige andre tilstande så som fx Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) (Nielsen et al., 2008) og foderrelateret diarré. I neonatale grise er fundet meget hyppigt i forbindelse med diverse forskellige diarrétilstande (Brown et al., 2007).

Den hyppigste mikroskopiske forandring i diarré-grise var svind af tarmtrævler. Sådanne forandringer er et meget almindelige i forbindelse med diarré-tilstande (Barker et al., 1993). I dette studie var svindet af tarmtrævlerne hverken associeret med nogen af de undersøgte infektioner eller sult.

Slimhinde skader i tyktarmen var også et nogenlunde gennemgående træk hos diarrégrise i dette studie. Dog var forekomsten så lav at det ikke kan siges at være et fund der er stærkt knyttet til syndromet.

Da der ikke var nogen kontrol-besætninger (besætninger der ikke led af NNPDS) med i studiet er det generelt umuligt at sige om de fund, der er gjort (atoniske tarme og mælkefyldte ventrikler) er karakteristiske for besætninger med NNPDS, eller om de ville kunne findes i alle typer af besætninger.

Dette spørgsmål skulle gerne blive afklaret i forbindelse med et igangværende projekt med mange deltager-besætninger.

Studiet er det første i verden, der forsøger at beskrive fænomenet NNPDS. Årsagen til syndromet er endnu ikke fastlagt, men studiet viser, at der enten er tale om en uopdaget infektion eller ikke-infektiøse faktorer. Praktiske erfaringer viser at fx et højt proteinniveau i sofoderet kan forårsage diarré hos neonatale grise. Alle besætninger i undersøgelsen havde imidlertid allerede forsøgt at minimere protein-niveauet uden nogen forebyggende effekt. Studiet viste også at diarréen i besætningerne ikke var relateret til sult. Måske kan begivenheder i fostertilstanden (energimangel/ sult i fostertilstanden) have påvirket udviklingen af tarmtrævlernerne.

Det uspecifikke udseende af tarmforandringerne i studiet understreger udfordringerne ved at diagnosticere tarmlidelser hos neonatale grise. Desværre har tarmforandringer i denne aldersgruppe af grise en tendens til at ligne hinanden, uanset den bagvedliggende årsag.

## Konklusion

Studiet bekræfter at der findes et diarrésyndrom hos grise inden for den første leveuge, som ikke kan forklares af de infektioner, man traditionelt har forbundet med spædgrisediarré i Danmark (*E. coli*, rotavirus og *C. perfringens* type C). Syndromet kunne heller ikke relateres til dårligt management eller sult hos grisene.

TGEV og PEDV, som i andre lande volder alvorlige problemer med diarré, blev ikke påvist, og må fortsat regnes for ikke at forekomme i Danmark. *C. difficile*, som lader til at være et stort problem i andre lande, blev kun påvist i meget ringe omfang uden tilknytning til forekomsten af diarré. *Cp* type A viste sig ved dyrkning at være omvendt associeret med diarré og undersøgelser af forekomsten af beta-2 toxin i tarmindehold viste ingen sammenhæng med diarré.

Der kunne ikke påvises en entydig overordnet infektiøs årsag til syndromet, men i én besætning så det ud til at et samspil mellem EAST-1 positive *E. coli* og *Enterococcus hirae* havde betydning.

## Efterskrift

Projektet er gennemført som led i en Erhvervs-PhD-uddannelse og er lavet i samarbejde med Danmarks Tekniske Universitet (DTU) og Københavns Universitet (KU).

# Referencer

- Barker, I.K., Van Dreumel, A.A., Palmer, N., 1993. Pathophysiology of enteric disease. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (Eds.), Pathology of Domestic Animals, Vol. 2. Academic Press, Inc., San diego, pp. 111-112-118.
- Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R., 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol* 100:1/2, 11-16.
- Brown, C.C., Baker, D.C., Baker, I.K., 2007. Alimentary system. In: Grant Maxie, M. (Ed.), Pathology of Domestic Animals, Vol. 2. Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 1-296.
- Bueschel, D.M., Jost, B.H., Billington, S.J., Trinh, H.T., Songer, J.G., 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet Microbiol* 94:2, 121-129.
- Choi ChangSun, Cho WanSeob, Chung HanKook, Jung TaeWon, Kim JungHyun, Chae, C., 2001. Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease. *Veterinary Microbiology*; 2001.81: 1, 65-71.
- Cruz Jr, E.C., Salvarani, F.M., Silva, R.O.S., Silva, M.X., Lobato, F.C.F., Guedes, R.M.C., 2013. A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. *Pesquisa Vet Brasil* 33, 963-969.
- Farzan, A., Kircanski, J., DeLay, J., Soltes, G., Songer, J.G., Friendship, R., Prescott, J.F., 2013. An investigation into the association between *cpb2*-encoding *Clostridium perfringens* type A and diarrhea in neonatal piglets. *Can J Vet Res* 77:1, 45-53.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749-1757.
- Frydendahl, K., 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and oedema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* 85:2, 169-182.
- Gin, T., Guennec, J.L., Morvan, H., Martineau, G.P., 2010. <br />Clinical and laboratory investigations in 10 French pig herds dealing with enzootic neonatal diarrhea. In: Proceedings of the 21st IPVS Congres, Vancouver, Canada, pp. 758.



- Jensen, T.K., Haugegaard, S., Boye, M., 2008. Demonstration of *Fusobacterium necroforum*-associated necrotizing enterocolitis by fluorescent In situ Hybridization in weaned pigs. In: - Proceedings of the Concurrent Meetings of the ACVP and ASVCP, San Antonio, Texas, pp. 772.
- Larsson, J., Grandon, R., Lindberg, R., Aspan, A., Jacobson, M., 2013. Neonatal porcine diarrhoea associated with small intestinal colonisation of Enterococcus spp. In: Proceedings of the Joint Meeting of the 5th European Symposium of Porcine Health Management and the 50th Anniversary Meeting of the Pig Veterinary Society of Great Britain, Edinburgh, UK.
- MaddoxHyttel, C., Langkjaer, R.B., Enemark, H.L., Vigre, H., 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs - occurrence and management associated risk factors. Vet Parasitol 141, 48-59.
- Melin, L., Wallgren, P., Mattsson, S., Stampe, M., Lofstedt, M., 2010. Neonatal diarrhoea in piglets from E.coli vaccinated sows in Sweden. In: , pp. 290.
- Meyer, C., Joachim, A., Dauschies, A., 1999. Occurrence of Isospora suis in larger piglet production units and on specialized piglet rearing farms. Veterinary Parasitology; 1999.82: 4, 277-284.20 ref .
- Nielsen, E.O., Enoe, C., Jorsal, S.E., Barfod, K., Svensmark, B., BilleHansen, V., Vigre, H., Botner, A., Baekbo, P., 2008. Postweaning multisystemic wasting syndrome in Danish pig herds: productivity, clinical signs and pathology. Veterinary Record; 2008.162: 16, 505-508.12 ref .
- Park, S., Kim, H., Moon, H., Song, D., Rho, S., Han, J., Nguyen, V., Park, B., 2010. Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea. Arch Virol 155, 1803-1811.
- Shan, T.L., Li, L.L., Simmonds, P., Wang, C.L., Moeser, A., Delwart, E., 2011. The fecal virome of pigs on a high-density farm. Journal of virology 85, 11697-11708.
- Svensmark, B., 2009. New Neonatal Diarrhoea Syndrome in Denmark. In: Proceedings 1st ESPHM, Faculty of Life Sciences, Copenhagen, Denmark, pp. 27.
- Vitovec, J., Koudela, B., 1992. Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. Vet Parasitol 43:1/2, 25-36.
- Vu-Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Mora, A., Lopez, C., Gonzalez, E.A., Blanco, J., 2007. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of Escherichia coli isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. Vet J 174:1, 176-187.

- Wallgren, P., Mattsson, S., Merza, M., 2012. New neonatal porcine diarrhoea. II. Aspects on etiology. In: pp. 76.
- Yaeger, M., Funk, N., Hoffman, L., 2002. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including Clostridium difficile and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Vet Diagn Invest 14, 281-287.
- Zajacova, Z.S., Konstantinova, L., Alexa, P., 2012. Detection of virulence factors of Escherichia coli focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in astA positive strains. Vet Microbiol 154:3/4, 369-375.
- Zhang, W.P., Zhao, M.J., Ruesch, L., Omot, A., Francis, D., 2007. Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. Vet Microbiol 123:1/3, 145-152.

Aktivitetsnr.: 053-400990  
 Journalnr.: 3412-09-02519  
 Journalnr.: 10-084232

//PB//

---

## VIDENCENTER FOR SVINEPRODUKTION

Tlf.: 33 39 40 00

Fax: 33 11 25 45

[vsp-info@lf.dk](mailto:vsp-info@lf.dk)

en del af



Landbrug & Fødevarer

Ophavsretten tilhører Videncenter for Svineproduktion. 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.

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