

INGEN EFFEKT AF BIOCIDET BIOVIR PÅ FOREKOMSTEN AF MRSA I STALDEN

MEDDELELSE NR. 1144

Desinfektionsmidlet BioVir kunne ikke nedsætte forekomsten af MRSA hos dyrene eller i staldluften. BioVir blev anvendt som grunddesinfektion og forstøvet ud over grisene to gange om ugen. Endvidere var strøelsen (halm) behandlet med BioVir.

INSTITUTION: SEGES SVINEPRODUKTION, DEN RULLENDE AFPRØVNING
FORFATTER: POUL BÆKBO, HELLE MØLGAARD SOMMER, CARMEN ESPINOSA-GONGORA*,
KARL PEDERSEN*, NILS TOFT*
*VETERINÆRINSTITUTTET, DTU
UDGIVET: 12. SEPTEMBER 2018

Dyregruppe: Søer og smågrise
Fagområde: Arbejds miljø og sundhed

Sammendrag

En løbende eksponering for desinfektionsmidlet BioVir ser ikke ud til at kunne nedsætte forekomsten af MRSA hos dyrene eller i staldluften. Ligeledes var det ikke muligt at observere en effekt på smågrisenes produktivitet (daglig tilvækst og dødelighed), hvor ofte de måtte behandles med antibiotika eller på forekomsten af infektioner med *Lawsonia* og *E.coli*.

Effekten af BioVir blev undersøgt i en sobesætning med produktion af 30-kgs smågrise. Formålet var at afklare, om BioVir kunne reducere MRSA-forekomsten hos grisene, i støvet og i staldluften (primær effektparameter) samt forbedre produktiviteten hos smågrisene (tilvækst). Endvidere blev dødelighed og antibiotikaanvendelse opgjort. Undersøgelsen blev gennemført med parallelt og samtidigt forløbende forsøgs- og kontrolstalde, der indbefattede både farestalde og smågrise stalde.

BioVir blev anvendt som grunddesinfektion mellem hvert hold i både fare- og smågrisestalde og derudover forstøvet ud over grisene to gange om ugen fra fødsel til afgang fra smågrisestalden (koldtåge). Endvidere var strøelsen (halm) behandlet med BioVir.

Baggrund

MRSA står for Methicillin resistente *Stafylococcus aureus*, dvs. en stafylokok-bakterie, der er resistent for antibiotikummet methicillin, hvilket tillige gør den resistent overfor alle andre beta-lactamer, herunder penicillin, samt andre antibiotika. Denne type stafylokok giver normalt ikke anledning til sygdom hos grise. Hos mennesker kan den derimod give hudinfektioner og småbylder i huden. Langt de fleste mennesker, der bærer bakterien (i næsen og på huden), er såkaldte raske smittebærere. Oftest vil både dyr og mennesker, der bærer bakterien, dermed ikke have tegn på smitte. På hospitalerne udgør stafylokokker og herunder MRSA en udfordring med såkaldte hospitalsinfektioner, der bl.a. kan give blodforgiftning (septikæmi). MRSA har været kendt siden 1960'erne og udgør en stigende udfordring på hospitalerne i Danmark og resten af verden, men stigningen i MRSA infektioner herhjemme ses dog i samfundet og dermed uden for plejesektoren.

Siden 2005 er en speciel husdyrtype-MRSA med betegnelsen CC398 påvist hos grise i Centraleuropa, hvor den hurtigt fik en stor udbredelse – specielt i svinebesætninger men også i kalve- og fjerkræbesætninger og i mindre udstrækning i hesteholdet. MRSA CC398 blev første gang påvist i en dansk gris i Danmark i 2007. Ved den sidste screening af danske svinebesætninger i 2016 blev det observeret, at MRSA CC398 må forventes at forekomme i 88 % af danske svinebesætninger og i de fleste avlsdyrsbesætninger. MRSA-husdyrtypen (CC398) er herudover påvist hos mink, heste og i en lille udstrækning hos kvæg i Danmark. Den er ligeledes tilpasset dyr og overlever derfor normalt kun kort tid hos de fleste mennesker. Hovedparten af de personer, der bliver smittet ved besøg i en smittet svinebesætning, vil tabe bakterien spontant i løbet af én eller få dage. MRSA CC398 kan spredes mellem besætninger ved handel af dyr, men også mennesker betragtes at udgøre en væsentlig smitterisiko.

For at mindske risikoen for at MRSA CC398 spreder sig til det omgivende samfund, er der et klart ønske om at reducere forekomsten og smitemængden i danske svinebesætninger. Der er derfor et stort behov for at undersøge, hvordan forekomsten af MRSA CC398 kan nedsættes markant – hvilke cost-effektive teknologier har vi til rådighed?

BioVir™ er et biocid og tilhører et nyt desinfektionsprincip. Det er uden faremærkning og kan

anvendes med dyr og mennesker i stalden. Produktet viser en god effekt ved laboratorieundersøgelser mod relevante smitstoffer samt mod MRSA.

Projektets formål var at afklare, om biocidet BioVir™ kan nedsætte smitteniveauet af MRSA CC398 i svinestalde

Materialer og metoder

Undersøgelsen er gennemført i én sobesætning med produktion af smågrise.

Det blev undersøgt, om brug af BioVir ved tågedesinfektion samt BioVir-behandlet strøelse (halm) efter nedenstående plan kunne reducere MRSA-forekomsten (primær effektparameter) og forbedre produktiviteten og sundheden hos smågrisene (sekundære effektparametre: tilvækst, dødelighed og antibiotikaanvendelse samt forekomst af smitstoffer, der kan give sygdom hos grisene).

Undersøgelsen blev gennemført med parallelt og samtidigt forløbende forsøgs- og kontrolstalde, der indbefattede både farestalde og smågrisestalde. Dermed tjente den ene halvdel af staldene som forsøgsstalde og den anden halvdel som kontrolstalde.

Forsøgsgruppe

Farestald (uge 0 til 4) og smågrisestald (uge 4 til 12):

- Staldene blev rengjort grundigt og desinficeret med BioVir under anvendelse af en koldtågemaskine mellem hvert hold (3,5 L BioVir pr. grunddesinfektion). Inden indsættelse af dyr blev der strøet med BioVir-behandlet halm.
- Umiddelbart (samme dag) efter indsættelse af de drægtige søer i farestalden blev der desinficeret med BioVir under anvendelse af en koldtågemaskine.
- Ammesøer, der blev flyttet ind i en forsøgsstald, blev desinficeret grundigt på hele hudoverfladen med BioVir umiddelbart inden indsættelsen (overbruset med en rygsprøjte).
- Umiddelbart inden flytning af grise fra farestald til klimastald blev gangarealerne rengjort og desinficeret med BioVir.
- To gange om ugen blev der desinficeret med en koldtåge af BioVir (2,5 L middel pr. gang i både farestald og klimastald). Det blev sikret, at koldtågen blev fordelt godt i staldrummet og kom ud i alle hjørner af stierne. I forbindelse med koldtågingen blev der lukket for afgangsventilationen i ti minutter.

- Der blev dagligt strøet med BioVir-behandlet halm (3 %). I farestaldene anvendtes 10-20 kg pr. stald pr. uge og i smågrisestaldene ca. 48 kg pr. stald pr. uge fordelt på to gange pr. uge.

Kontrolgruppe

Farestald (uge 0 til 4) og smågrisestald (uge 4 til 12):

- Blev rengjort grundigt mellem hvert hold efter besætningens normale procedurer (uden anvendelse af desinfektionsmiddel).

Besætningsbeskrivelse

Besætningen har 700 årssøer og producerer 19.000 smågrise pr. år, som sælges ved 30 kg til fast aftager. Produktionen gennemføres i fire farestalde (heraf tre ens á 34 stier) og i otte ens smågrisesektioner (á 408 stipladser fordelt på 34 stier). Besætningen ventileres ved diffus ventilation. Besætningen anvender hjemmeblandet tørfoder. I drægtighedsstalden anvendes gulvfodring til små stabile grupper (10-15 søer/sti).

Til undersøgelsen anvendtes de tre ens farestalde (194 m² og 581 m³) og det antal ens smågrisesektioner (194 m² og 581 m³), der var nødvendige som aftager af de fravænnede grise fra farestaldene.

Søerne/grisene forblev i sektionen efter indsættelse, og dyrene måtte ikke flyttes mellem forsøgs- og kontrolgruppen.

Ved indgangen til alle forsøgssektioner skiftede personalet til støvler, som stod i den pågældende sektion. De iførte sig desuden en overtræksdragt ved indgangen i forsøgssektionerne for ikke at overføre støv og snavs fra kontrolsektioner og det øvrige staldanlæg. Nye vogne til strøelse samt redskaber til brug udelukkende i forsøgssektionerne var indkøbt for ligeledes at opdele udstyr i kontrol/forsøg.

Registreringer

For hver staldsektion blev følgende målt og registreret:

Farestald:

- Antal søer
- Pattegrise – dødelighed

- Antal levendefødte grise
- Antal fraflyttede grise
- Antal døde grise
- Antal fravænnede grise
- Forekomst af MRSA-positive søer samt smitteniveau (kvantificering af MRSA) hos positive søer ved indsættelse og afgang (næsesvaberprøver fra 15 søer pr. stald)
- Forekomst af positive pattegrise og smitteniveau ved afgang fra farestald (næsesvaberprøver fra to grise pr. hver af de 15 søer = 30 grise i alt)
- Kontinueret måling af MRSA i luftprøver ved indsættelse og afgang (dobbeltmålinger med en Sartorius-sampler)
- To støvprøver ved indsættelse og to ved afgang
- To EDC-støvsamplers placeret i en uge på hulelåget ved indsættelse og afgang
- CO₂ måling ved hver MRSA-luftmåling (dobbeltmåling)

Smågrisestald:

- Daglig tilvækst og dødelighed
 - Antal indsatte smågrise
 - Samlet vægt på indsatte grise
 - Dato for dødsfald + antal + vægt
 - Dato og vægt på grise flyttet ud af sektionen f.eks. til sygesti
 - Antal grise ved afgang
 - Samlet vægt ved afgang
- MRSA smitteniveau ved afgang (næsesvaberprøver fra 26 grise: to pr. sti + luftprøver med Sartorius-sampler, støvprøver og EDC-sampler (med en uges indsamlingstid))
- CO₂ måling ved hver MRSA-luftmåling (dobbeltmåling))
- Behandling med antibiotika
- Sokkeprøve fra stibunden ved afgang til undersøgelse for *Lawsonia*, *E.coli* og *Brachyspira* bakterier (analyse af DNA ved qPCR)

Undersøgelsen blev dimensioneret til at skulle gennemføres med 14 forsøgs- og 14 kontrolhold.

På denne måde er farestaldssektion og smågrisestaldssektion tilknyttet inden for hver gruppe (dvs. at ét hold var so/grise fra faring til afgang fra smågrisestald). Tidsmæssigt gennemførtes forsøgs- og kontrolhold sideløbende. Staldsektionen var forsøgsenheden.

Da ni ud af de påtænkte 14 hold i smågrisestalden var gennemført, blev en statistisk analyse af

resultaterne foretaget for at vurdere, om undersøgelsen skulle færdiggøres.

CO₂ målinger var medtaget for at vurdere, om staldene var ventileret ens på prøveudtagningstidspunkterne (vedrørende MRSA i luften).

Statistisk metode

MRSA

De kvantitative målinger af MRSA (CFU = colony forming units) blev logaritmetransformeret for at imødekomme antagelserne bag analysemodellerne. For at undgå problemer med 0, blev alle analyser, opgørelser og illustrationer lavet på $\log(\text{cfu}+1)$. Alternative metoder til håndtering af 0 blev afprøvet med sammenlignelige resultater. Den primære forklarende variabel var gruppe (forsøg eller kontrol). Derudover indgik forsøgsrunden (nummer 1 til 9) samt en batch-variabel, der var kombinationen af gruppe og forsøgsrunde. For målinger på individuelle grise samt luft og støv indgik denne variabel som en tilfældig (random) effekt, der håndterede, at grise i samme batch er mere ens end grise fra forskellige batches. Der blev kun lavet én EDC-sampler måling pr. tidspunkt (indgang, afgang, afslutning), som derfor blev analyseret uden en tilfældig effekt af batchen. De individuelle målinger på grise blev analyseret særskilt for hvert tidspunkt, mens luft, støv og EDC blev analyseret samlet (en model for hver type).

Alle analyser blev gennemført i R (1), og modeller med tilfældig effekt blev analyseret med lmer fra lme4-pakken (2), mens EDC blev analyseret med lm.

Baseret på de deskriptive analyser af MRSA-bestemmelse (positiv/negativ) ved opformering blev det vurderet, at der ikke var grund til yderligere analyser af disse.

Produktivitet

Der blev opstillet og analyseret modeller på dødelighed, daglig tilvækst og behandling med antibiotika for data fra smågrisestalden. De forklarende variable, der indgik i modellerne, var *Gruppe*, *Runde* og *Sektion*. *Gruppe* havde to niveauer (forsøg/kontrol), *Runde* var en ny variabel, der var skabt for at kunne teste kontrol mod forsøg, hvor de tidsmæssigt lå tættest på hinanden, og *Sektion* havde otte niveauer, da forsøgene blev udført i otte forskellige sektioner. *Sektion* blev modelleret som en stokastisk variabel (random effect), hvor det var muligt.

Responsvariablene blev hhv. logaritmetransformeret og binært opdelt for at kunne imødekomme modeller til analysen. Data blev analyseret vha. Proc Mixed i SAS på nær de binære data, der blev

analyseret vha. Proc Genmod med en logit linkfunktion. De binære data fremkom ved at opdele flokbehandlingsdata i en gang flokbehandling eller to gange flokbehandling af holdet. Grunden til denne opdeling var, at flokbehandlingen drev hele behandlingsniveauet, og at det derfor var muligt at nøjes med at betragte antallet af gange, som et hold fik flokbehandling.

Resultater og diskussion

På baggrund af analysen af de første ni gennemførte hold i smågrisestaldene blev det besluttet at stoppe afprøvningen, da det blev vurderet, at en fortsættelse ikke ville ændre på konklusionen af afprøvningen.

MRSA

En samlet opgørelse over det kvantitative MRSA-niveau målt som colony forming units (CFU) og det kvalitative niveau af MRSA målt som procent positive (andelen af positive prøver efter evt. opformering af prøver, der var negative ved første dyrkning) fremgår af Tabel 1 for indgang og afgang i farestalden og af Tabel 2 for smågrisestalden.

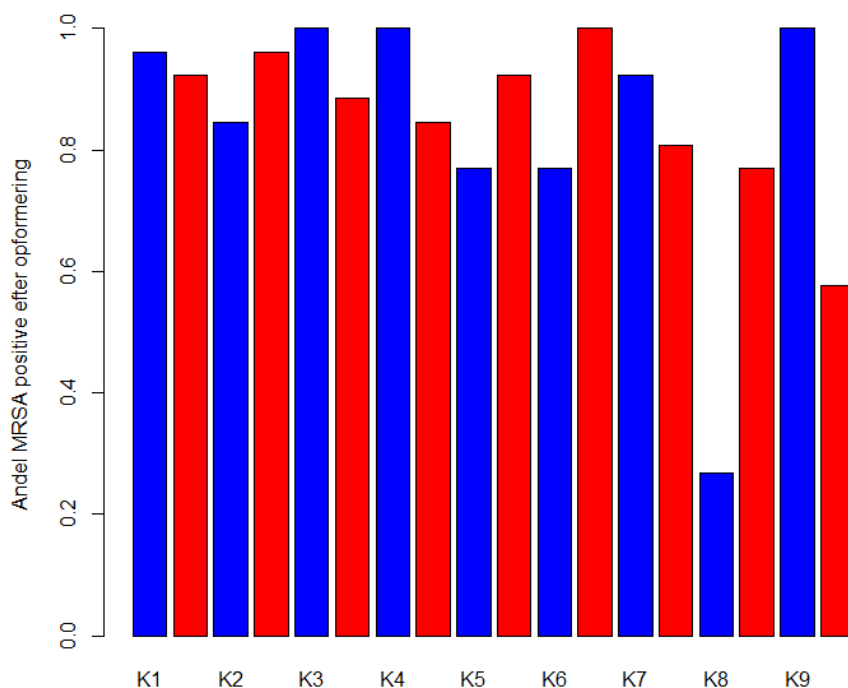
Tabel 1. Kvantitative og kvalitative opgørelser af MRSA ved indgang og afgang i farestalden. Log(cfu) er middelværdien af de logaritmetransformerede CFU-tællinger. Pos er antallet af positive prøver (efter evt. opformering). N er det samlede antal prøver af en given type.

Grupper i Farestalden		Kontrol		Forsøg	
Indgang		pos/N (%)	Log(cfu)	pos/N (%)	Log(cfu) (sd)
	Søer	47/135 (35)	0,45	68/135 (50)	0,70
	Luft	18/18 (100)	0,42	18/18 (100)	0,27
	Støv	7/9 (78)	4,80	5/9 (55)	2,56
	EDC	13/18 (72)	2,43	9/18 (50)	2,02
Afgang					
	Søer	47/120 (39)	0,77	61/131 (47)	1,18
	Pattegrise	83/239 (35)	0,78	101/262 (39)	0,80
	Luft	18/18 (100)	1,91	18/18 (100)	1,80
	Støv	8/9 (89)	4,93	6/9 (67)	5,42
	EDC	15/18 (83)	3,70	14/17 (82)	3,74

Tabel 2. Kvantitative og kvalitative opgørelser af MRSA ved afgang fra smågrisestalden. Log(cfu) er middelværdien af de logaritmetransformerede CFU-tællinger. Pos er antallet af positive prøver (efter evt. opformering). N er det samlede antal prøver af en given type.

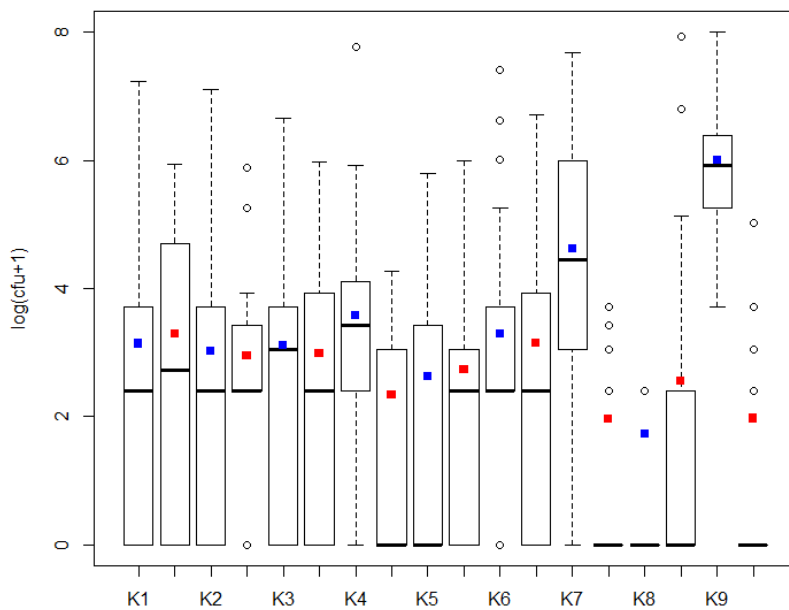
Grupper i smågrisestalden		Kontrol		Forsøg	
Afgang		pos/N (%)	Log(cfu)	pos/N (%)	Log(cfu) (sd)
	Grise	196/234 (84)	2,87	200/234 (85)	1,75
	Luft	16/16 (100)	4,00	18/18 (100)	2,90
	Støv	9/9 (100)	7,72	9/9 (100)	5,54
	EDC	17/18 (94)	5,36	18/18 (100)	4,46

Opgørelserne i Tabel 1 og 2 dækker over ret store forskelle mellem de enkelte hold. Figur 1 viser fordelingen af positive grise i smågrisestalden for kontrol og forsøg for de ni runder. Det er muligt at identificere en stor variation mellem de enkelte runder, hvor den største andel varierer mellem kontrol og forsøg.



Figur 1. Andelen af MRSA-positive grise ved afgang fra smågrisestalden for hvert af de ni kontrol- (blå) og ni forsøgshold (rød). K1 er det første sæt af smågrisestalde (blå og rød), K2 det andet og så fremdeles.

I Figur 2 er log (CFU) MRSA opgjort for de ni gennemførte runder af kontrol og forsøgshold. Der ses en betydelig variation i fordelingen (og middelværdien) af log(CFU) MRSA mellem de enkelte runder.



Figur 2. Fordelingen af log(cfu+1) MRSA for kontrol/forsøg for de gennemførte ni hold. Middelværdien for hver gruppe er angivet med blå (kontrol) eller rød (forsøg).

En statistisk analyse af data fra Figur 2 viste, at en model med interaktion mellem gruppe (forsøg/kontrol) og forsøgsrunde med batch som tilfældig effekt forklarede data bedst. Effekten blev dog drevet udelukkende af de høje niveauer i kontrolhold 7 og 9, og der var overordnet set ingen effekt af behandling (brug af BioVir). I en model uden interaktion var behandlingen ligeledes ikke signifikant.

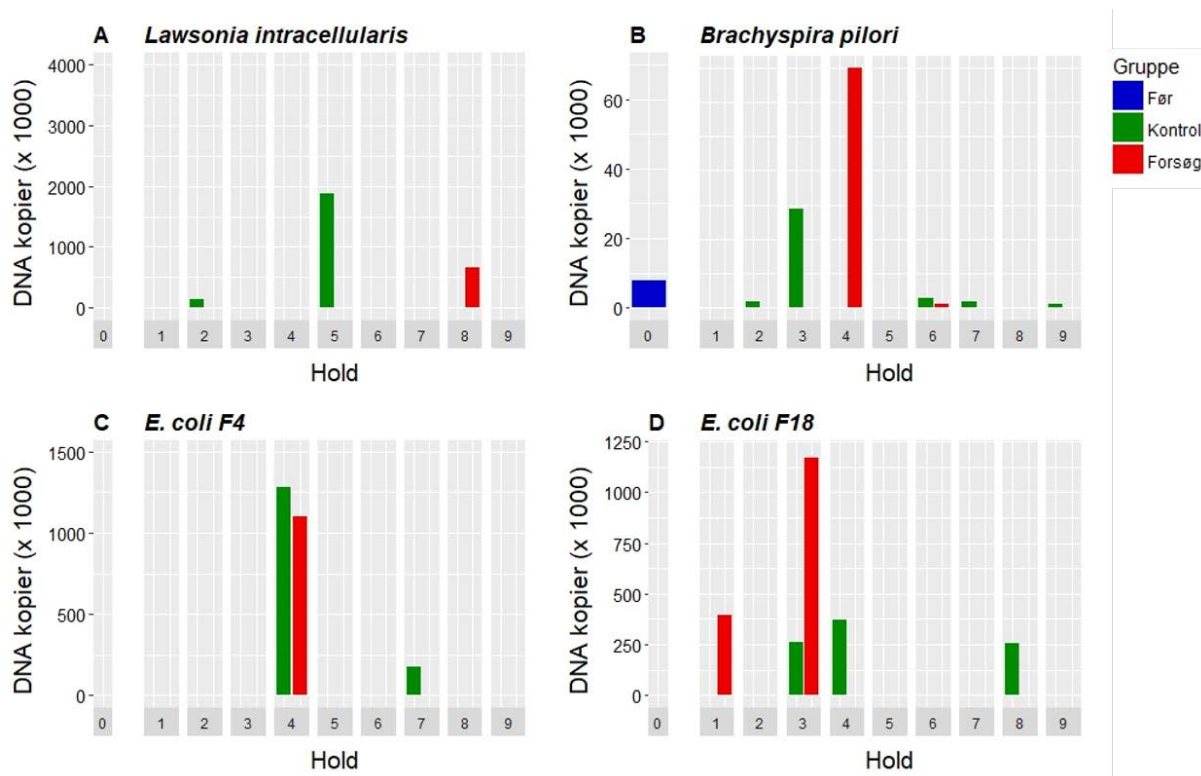
For søer og pattegrise i farestalden var andelen af positive for lille til, at det giver mening for projektet at analysere på de kvantitative målinger.

Analyser af luft-, støv- og EDC-sample målinger viste ingen effekt af behandling (brug af BioVir) men derimod en signifikant forskel mellem målinger ved indgang og afgang i farestald samt afslutning i smågrisestald med et stigende niveau gennem forløbet.

Diarrébakterier

Fra sokkeprøverne blev der fundet både *Lawsonia*, *Brachyspira* og *E. coli* (F4 & F18) i både forsøgs- og kontrolhold, dog kun i meget få hold (se Figur 3). Kigger man på forekomsten som enten/eller, findes *Lawsonia* i to kontrol- og to forsøgshold, *Brachyspira* i fire kontrol- og to forsøgshold, *E. coli* F4 i to kontrol- og to forsøgshold samt *E. coli* F18 i tre kontrol- og to forsøgshold. Der var således ingen

tegn på, at forsøgsgruppen havde et lavere niveau af diarréfremkaldende bakterier. Det skal dog bemærkes, at der er meget få "udbrud", hvilket gør det vanskeligt at udtale sig om effekten.



Figur 3. Antallet af DNA kopier (x1000) for *Lawsonia*, *Brachyspira*, *E.coli* F4 og *E.coli* F18 målt ved qPCR på stibundssokkeprøver før opstart af afprøvningen samt ved afslutningen af hvert hold i smågrisestalden.

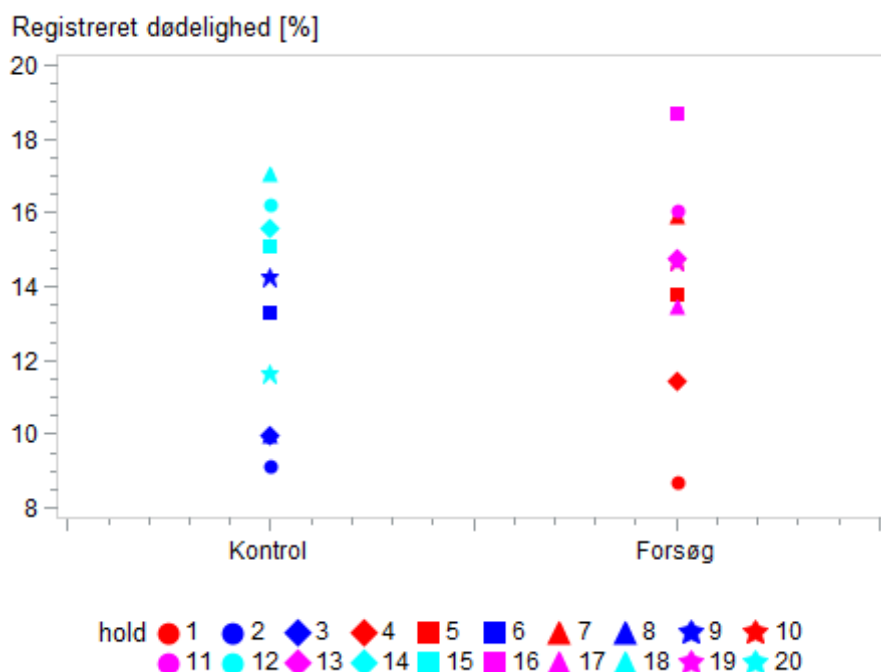
Produktivitet

Det var ikke muligt at finde forskelle i produktiviteten mellem de to grupper i farestalden (se Tabel 3).

Tabel 3. Resultater fra farestaldene.

Grupper	Kontrol	Forsøg
Antal søer	309	315
Antal hold	10	10
Antal levendefødte	4850	5005
Antal fravænnede	4106	4149
Døde pattegrise	13 %	14 %
heraf klemt, bidt	5,1 %	5,3 %
heraf sult, kulde	5,1 %	4,9 %
heraf svagt født	1,6 %	3,0 %
heraf ledbetændelse	0,1 %	0,3 %
heraf diarré	0,3 %	0,0 %
heraf andet	1,8 %	1,7 %

Dødeligheden blandt pattegrisene varierede en del fra hold til hold. Figur 4 illustrerer, at hold 1 og 2, hold 3 og 4, og så fremdeles tidsmæssigt er gennemført samtidigt (dog med en til to ugers forskydning), så forsøgs- og kontrolhold konstant er kørt og analyseret parvis (= en Runde).



Figur 4. Registreret procentvis dødelighed i farestalden fordelt på *Gruppe* (forsøg og kontrol) og *Hold*.

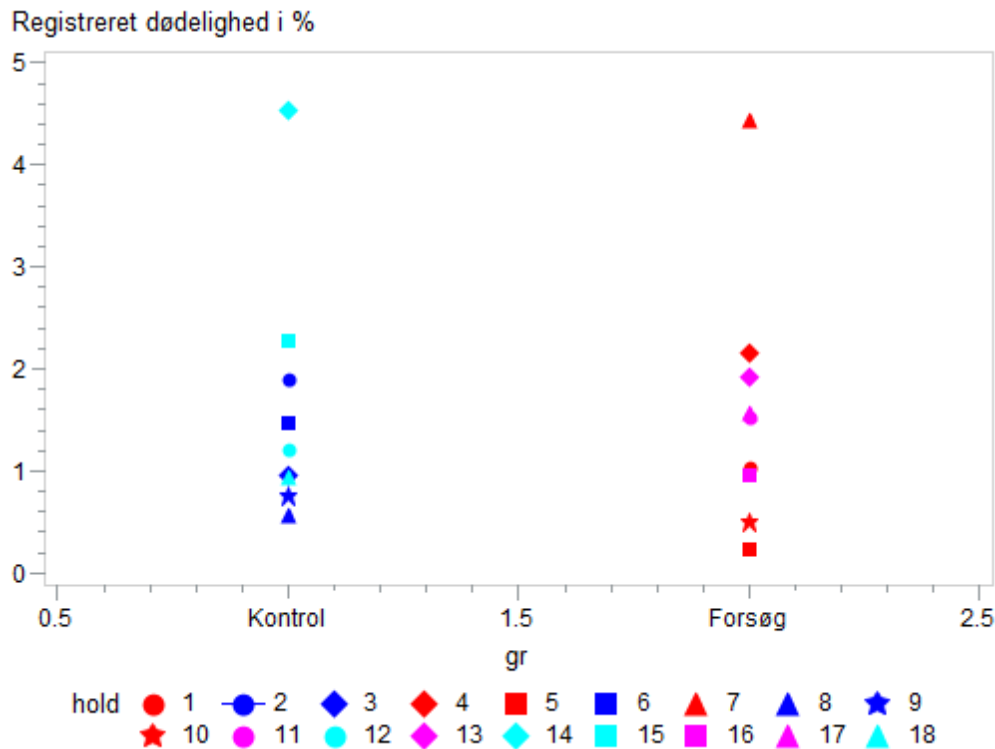
Der blev ikke fundet nogen forskelle i produktiviteten mellem de to grupper i smågrisestalden (se Tabel 4). Der var således ingen statistisk sikker forskel mellem forsøg og kontrol mht. daglig tilvækst ($P = 0,4$), dødelighed ($P = 0,8$) og behandling ($P = 0,4$). Angående behandlinger gav flokbehandlinger samlet anledning til de fleste behandlingsdage. Alle smågrise blev således behandlet i 8-9 % af den tid, de opholdt sig i smågrisestalden. Behandlingsfrekvensen var en anelse over 1 % lavere i forsøgsgruppen, men forskellen var ikke signifikant (behandlingsfrekvensen var dog heller ikke en primær parameter, og undersøgelsens størrelse var derfor heller ikke dimensioneret herefter).

Tabel 4. Resultater fra smågrisestaldene.

Grupper	Kontrol	Forsøg
Antal produceret svin	3429	3591
Antal hold	9	9
Vægt ved indsættelse	6,8 kg	7,0 kg
Vægt ved afgang	27,9 kg	27,4 kg
Daglig tilvækst	462 gram	462 gram
Døde pattegrise	1,6 %	1,6 %
heraf mavetarm	1,0 %	1,0 %
heraf benproblemer	0,1 %	0,0 %
heraf hjernebetændelse	0,3 %	0,2 %
heraf andet	0,3 %	0,4 %
Behandlingsdage, flokvis ¹⁾	9,4 %	8,2 %
Behandlingsdage, individuelt	0,13 %	0,22 %
heraf mave-tarm lidelse	0,10 %	0,16 %
heraf benproblemer	0,02 %	0,04 %
heraf hjernebetændelse	0,01 %	0,02 %
heraf luftvejslidelser	0,00 %	0,00 %
heraf halebid	0,00 %	0,00 %

¹⁾ Angiver i hvor mange % af dagene alle grise er behandlet.

Dødeligheden blandt smågrisegrisene varierede fra hold til hold. Figur 5 illustrerer, at hold 1 og 2, hold 3 og 4, og så fremdeles tidsmæssigt er gennemført samtidigt (dog med en til to ugers forskydning), så forsøgs- og kontrolhold altid er kørt og analyseret parvis (= en Runde).



Figur 5. Registreret procentvis dødelighed i smågrisestalden fordelt på *Gruppe* og *Hold*.

CO₂-målingerne ved MRSA støvmålingerne i smågrisestaldene viste, at disse ved hovedparten af holdene lå på samme niveau (data ikke vist). I få hold var der en væsentlig forskel, men der var ingen systematik i forskellen. Det vurderes således, at ventilationsgraden af staldene ikke har kunnet påvirke MRSA-målingerne i luften.

Konklusion

På trods af, at grisene helt fra fødsel til afgang fra smågrisestalden ved ca. 28 kg blev eksponeret for desinfektionsmidlet BioVir i strøelsen og ved forstøvning i staldrummet to gange om ugen, har det ikke været muligt i denne undersøgelse at påvise en gavnlig effekt på forekomsten af MRSA i grisene eller i støvet. Det har heller ikke været muligt at se en effekt på produktiviteten eller sundheden hos grisene.

Deltagere

Tekniker: Linda Sandberg Pedersen

Statistiker: Helle Sommer

Referencer

- [1] R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL, <https://www.R-project.org>
- [2] Douglas Bates, Martin Maechler, Ben Bolker, Steve Walker (2015). Fitting Linear Mixed Effects Models Using lme4. Journal of Statistical, Software, 67(1), 1-48.
doi:10.18637/jss.v067.i01

Afprøvning nr. 1473
Aktivitetsnr.: 075-130340

//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.