

Slutredovisning:

Dynamiken av luftvägspatogener i en slaktgrisbesättning

Carl-Johan Ehlorsson¹, Erik Nörregård¹ och Per Wallgren²

¹ Gård & Djurhälsan

² SVA, Statens Veterinärmedicinska Anstalt.

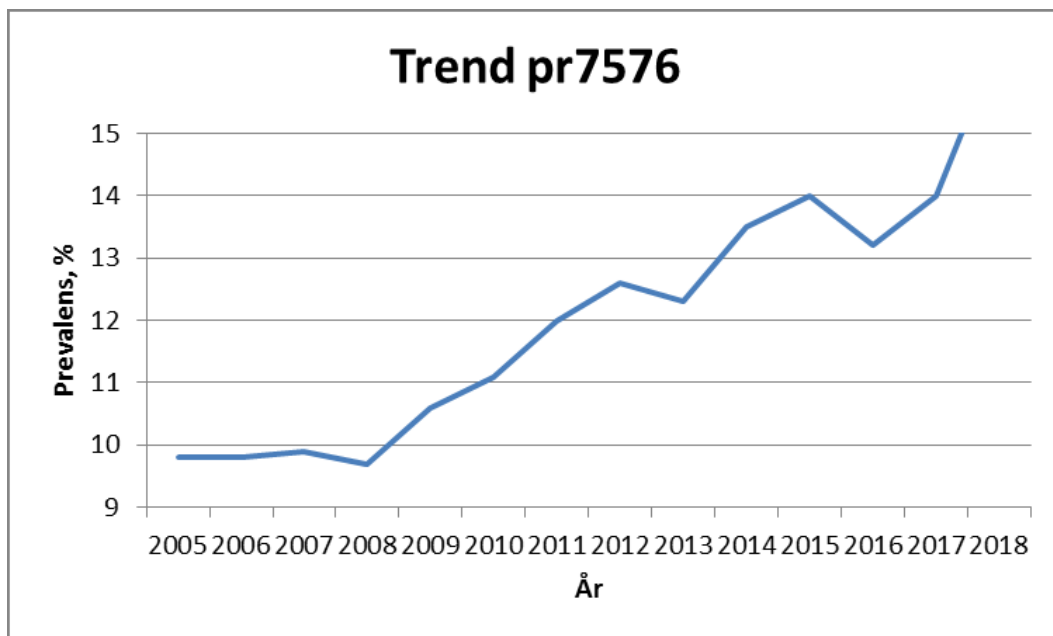
Bakgrund

Problemen med luftvägsinfektioner i grisbesättningar har ändrat karaktär i takt med att besättningarna ökat i storlek. Idag är sjukdomsbilden mer komplex och relateras såväl till primärpatogena infektioner, lindriga primära infektioner, s.k. primers, som till sekundärinfektioner. Därför talas det ofta om PRDC – Porcine Respiratory Disease Complex (se nedan). Trots förebyggande insatser såsom sektionering, vaccinering och omgångs-uppfödning förekommer ibland akuta sjukdomsutbrott av PRDC med en eller flera olika mikroorganismer inblandade. Dessa kan vara Mykoplasma, Actinobacillus, Influenta A och/eller Pasteurella, där kanske framförallt sekundärinfektioner med Pasteurella medför djurlidande, ökad dödlighet, sämre ekonomi och ökad antibiotikaanvändning.

Grisens försvar mot luftvägsinfektion inleds med att inandningsluften filtreras genom fina hår i näsmusslorna vars tredimensionella uppbyggnad och slemhinnans struktur har goda möjligheter att fånga upp partiklar, bakterier och virus. De flesta partiklar som andas in fångas upp i noskaviteter, svalget och luftstrupen. De mikrober som ändå passerar denna spärr fångas förhoppningsvis upp av flimmerhåren i bronkerna och transporteras i slem tillbaka till näskaviteten. Om så inte sker i tillräcklig omfattning kommer lungorna att infekteras och där har olika mikrober olika predilektionsställen; Mykoplasma hyopneumoniae (M hyo) och virus återfinns framför allt i de väl ventilerade främre lungflikarna medan Actinobacillus pleuropneumoniae (App) ofta återfinns i de bakre delarna av lungorna som kallas diafragmaloberna.

I Sverige sjönk andelen registrerade luftvägssjukdomar kraftigt under 1990-talet då ålderssektionerad produktion infördes på bred front som en direkt följd av förbudet att använda lågdosantibiotika i tillväxtfrämjande syfte som genomfördes 1986. Andelen registrerade pneumonier har sedan dess legat kvar på denna låga nivå och i många besättningar är grisarna seronegativa mot M hyo vid slakten. Andelen pleuriter har däremot ökat konstant sedan sekelskiftet (Figur 1). Dessa kan ibland länkas till App, men inte alltid. I en tidigare undersökning (Wallgren och medarbetare 2016) kunde vi identifiera 4 olika infektionsmönster;

- 1) Infektion med App utan andra infektioner (klassiskt mönster, i Sverige oftast App serotyp 2)
- 2) Infektion med App följt av Pasteurella
- 3) Infektion med Pasteurella följt av App2
- 4) Infektion med Pasteurella utan närvaro av App



Figur 1. Incidensen registrerade brösthinneinflammationer som registrerats vid slakt under perioden 2005 - 2017 i Sverige (Nationella slaktdatabasen).

Syfte

I det här projektet var syftet att studera infektions/sjukdomsförloppet i en slaktgrissuppfödning som under en längre tid haft problem med akuta och- eller kroniska luftvägsinfektioner. Besättningens problem har diagnostiserats i form av sjukdomsregistreringar i slakten och den kliniska bilden med hosta under uppfödningen.

Med PCR-teknik är det idag möjligt att påvisa närvaro av olika infektionsämnen på ett tidigt stadium. Genom att göra provtagningar långt ner i luftvägarna med s.k. tracheal-svabbar var avsikten att öka känsligheten hos PCR-diagnostiken ytterligare. Genom att samtidigt studera tracheal-svabbar och blodparametrar samt genomföra så kallad USK (Utökad Slakt-Kontroll) på lungorna i samband med slakten var förhoppningen att bättre kunna bedöma vilka olika agens som varit inblandade i utvecklingen av luftvägsinfektionerna.

Material och metod

Besättningen

Studien genomfördes i en integrerad besättning med ca 500 SIP. Ca 60 suggor grisar var tredje vecka. Besättningen producerar ca 8000 grisar till slakt per år, men man säljer även en del smågrisar. Smågrisarna vaccinerats mot circovirus typ 2 (PCV2) och *M hyopneumoniae* under diperioden.

Under flera år har slaktanmärkningarna för brösthinneinflammationer (pleuriter, kod 75/76) varit förhöjda och under de senaste åren har de på kvartalsnivå varierat mellan 27 och 43 % (Tabell 1). I övrigt har besättningen haft mycket få slaktanmärkingar. Kostnaden för revning av drabbade grisar är idag 20 kronor per gris, vilket medför att revningarna kostar besättningen cirka 75 000 kronor per år. Trots detta noterades endast enstaka akuta lunginflammationer per år under uppfödningen och endast ett fåtal grisar behandlades med antibiotika mot lunginflammation. Under det senaste året, innan undersökningen inleddes, behandlades totalt 9 grisar för lunginflammation av en årsproduktion på ca 8000 grisar (0,1 %).

Under de senaste åren har förekomsten av slaktanmärkningarna för brösthinneinflammationer ökat både generellt i Sverige (Figur 1) och på den aktuella gården (Tabell 1).

Tabell 1. Registreringar för pleurit i samband med slakt under det senaste året i besättningen.

	Kvartal 4/17	Kvartal 1/18	Kvartal 2/18	Kvartal 3/18
Kod 75/76	27 %	31 %	43 %	42 %
Kod 71/72	0,2 %	0,3 %	0,1 %	0 %

Provtagningar

Provtagning gjordes på 10 individuellt märkta grisar, 2 grisar i 5 olika boxar, fyra gånger under uppfödningstiden. Proven togs med 3 veckors intervall. Första provet togs strax efter insättning i slaktgrisavdelningen och sista provet veckan innan tömning av avdelningen. Vid provtagningen fixerades djuren med trynbrem. Provtagningen från trachea gjordes med en urinkateter för hund 3,3 x 500 mm. En rundstav placerades mellan käkarna på grisen och katetern fördes ner genom svalget i mittlinjen (bild 1) och vidare ner i trachea. Ibland utlöstes en lätt hostning när man kom ner till önskad provtagnings plats vid bifurcaturen av trachea.



Bild 1. Tracheal-provtagning med hjälp av en urinkateter för hund, 3,3x500 mm.

Vid varje provtagningstillfälle togs ett sekretprov från svalg/trachea (Bild 1) och ett blodprov (Bild 2) i serumrör, 7 ml. Proven från svalg/trachea undersöktes med PCR avseende närvaro av App, M hyo, Mykoplasma hyorhinis, Pasteurella multocida och Influenta A.

Blodproven centrifugerades och serumet frystes ner. När alla prov samlats in undersöktes serum för närvaro av antikroppar (absorbans) mot App serotyp 2 och 3, M hyo, Influenta A, Pasteurella multocida samt Haemophilus parasuis med olika ELISA-tekniker. Serum undersöktes även för innehåll av akutfasproteinet Serumamyloid (SAA).

I samband med slakt samlades 34 lungpaket in från gruppen där även de 10 provtagna grisarna fanns med. Dessa lungpaket undergick en utökad slaktkontroll (USK) där alla lungpaketen bedömdes av samma undersökare.

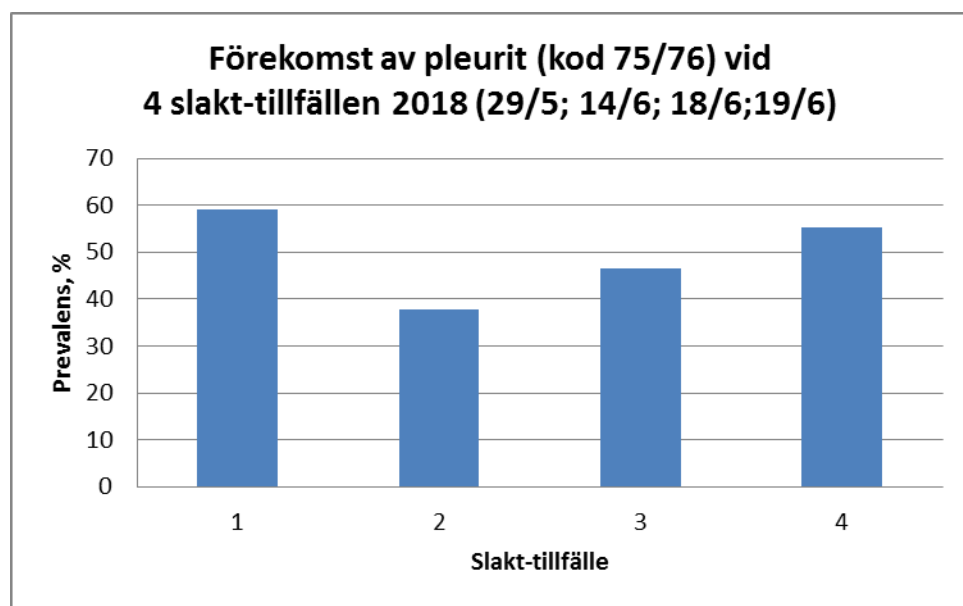


Bild 2. Blodprovstagning. Blodprov togs från halsvenen med 7 ml Vacutainerrör och 1,2 x 38 mm kanyler med backventil monterad på kanylhållare.

Resultat och diskussion

1. Slaktanmärkningar

Den aktuella uppfödningsomgången slaktades vid fyra tillfällen. I denna omgång registrerade pleuriter hos 49,7 % av grisarna. Som framgår av figur 2 varierade prevalensen mellan 38 och 59 % vid de fyra olika slakt-tillfällena.



Figur 2. Registreringar för pleurit vid slakt i den omgång som undersöktes. Omgången slaktades vid fyra olika tillfällen.

Resultaten vid USK visade att majoriteten av de totalt 34 undersökta lungpaket hade förändringar på lungorna (Tabell 2). Tjugoåtta stycken (82 %) hade kroniska pleuriter över de bakre övre lungorna (d.v.s. diafragmaloberna), vilket bekräftade den höga förekomsten av pleurit vid den ordinarie besiktningen (Figur 2). Den genomsnittliga utbredningen av förändringarna var däremot relativt liten (i genomsnitt var 13% av lungvävnaden förändrad). Endast en lunga påvisades med en akut pågående lunginflammation (bronchopneumoni) (Tabell 2).

Tabell 2. Resultat vid USK av 34 lungpaket från den undersökta omgången av slaktgrisar. Observera att en och samma gris kan ha såväl pneumoni som pleurit.

Undersökta lungor (n = 34)		Lungor med förändringar		Utbredning	
Typ av förändring		Antal	%	%	
<u>Mycoplasmaliknande förändring; Totalt</u>		6	17,6		
Katarrhal bronchopneumoni, okomplicerad	A	0			(1)
Katarrhal bronchopneumoni, komplicerad	B	1	2,9	5,0	(1)
Ärr-retraktioner	A	5	14,7	2,4	(1)
<u>Pleuriter; Totalt</u>		28	82,4		
Pleuropneumoni, akut	C	0			(1)
Pleuropneumoni, kronisk	C	0			(1)
Pleuritis, akut		0			(2)
Pleuritis, caudodorsal, kronisk	C	28	82,4	13,1	(2)
Pleuritis, cranio-ventral, kronisk		0			(2)
<u>Inga förändringar; Totalt</u>		5	14,7		

Förklaringar: (1) = Volymprocent av lungvävnad: (2) = Arealprocent av lungvävnadens yta.

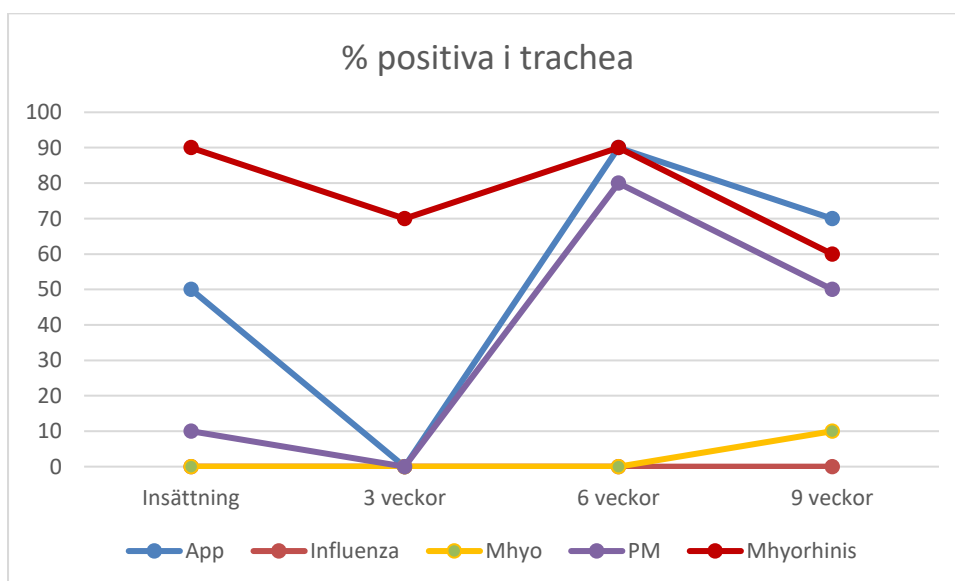
A Orsakas vanligen av infektion med *M. hyopneumoniae*

B Orsakas vanligen av infektion med *M. hyopneumoniae*, komplicerad med sekundär bakteriell infektion

C Orsakas vanligen av infektion med *A. pleuropneumoniae*

2. Trachealprover

Samtliga djur var negativa mot Influenza A (se figur 3). Endast ett av 40 prover var positivt mot *M. hyo* medan 60–90% av proven var positiva för *M. hyorhinis* (Se figur 3). Vid första provtagningen sågs positiva reaktioner mot App serotyp 2 (50 %) och mot *P. multocida* (10 %). Däremot testades grisarna negativt för dessa infektionssämnen vid den andra provtagningen. Under de två sista provtagningarna ökade dock andelen positiva djur markant (50–80% positiva).



Figur 3. Påvisande av DNA från olika mikroorganismer i trachealprov vid de olika provtagningstillfällena.

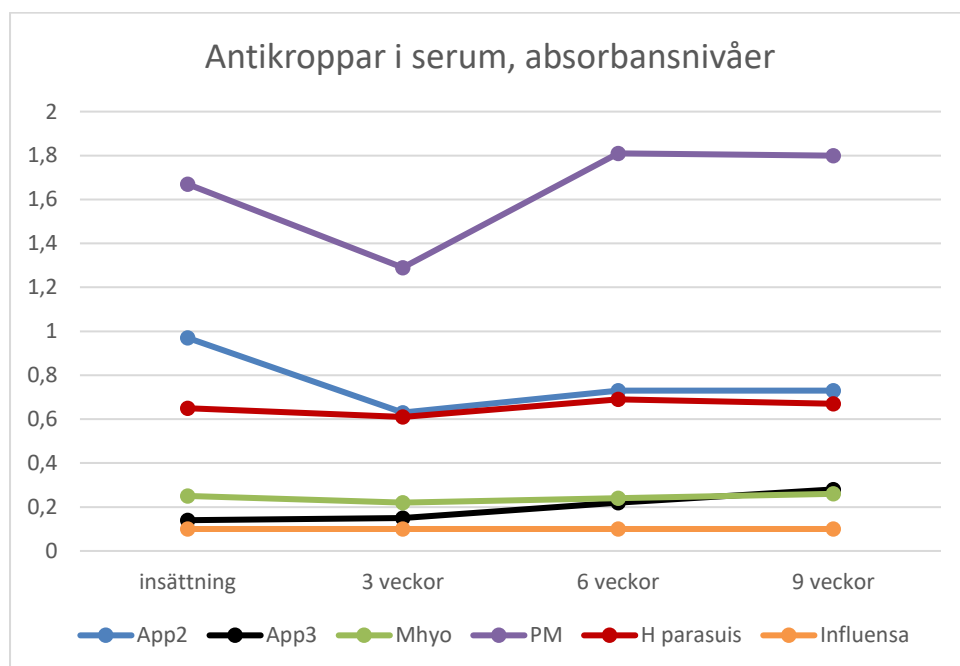
3. Serologiska undersökningar

Samtliga djur var seropositiva mot P multocida med höga nivåer av antikroppar redan vid ankomsten till slaktgrisstallet (se figur 4). Under den första treveckorsperioden sjönk nivån något även om den fortfarande var hög. Därefter stabiliserade sig Ak-nivåerna mot P multocida kring $A_{450} = 1,8$.

I stort sett samtliga djur (9 av 10) var även seropositiva mot App serotyp 2 vid ankomsten, men på en lägre nivå. Under den första treveckorsperioden sjönk medelabsorbansen något, men därefter stabiliserades nivån kring $A_{450} = 0,8$. Medelabsorbansen avseende H parasuis låg stabilt vid det positiva gränsvärdet (0,6) under hela uppfödningstiden.

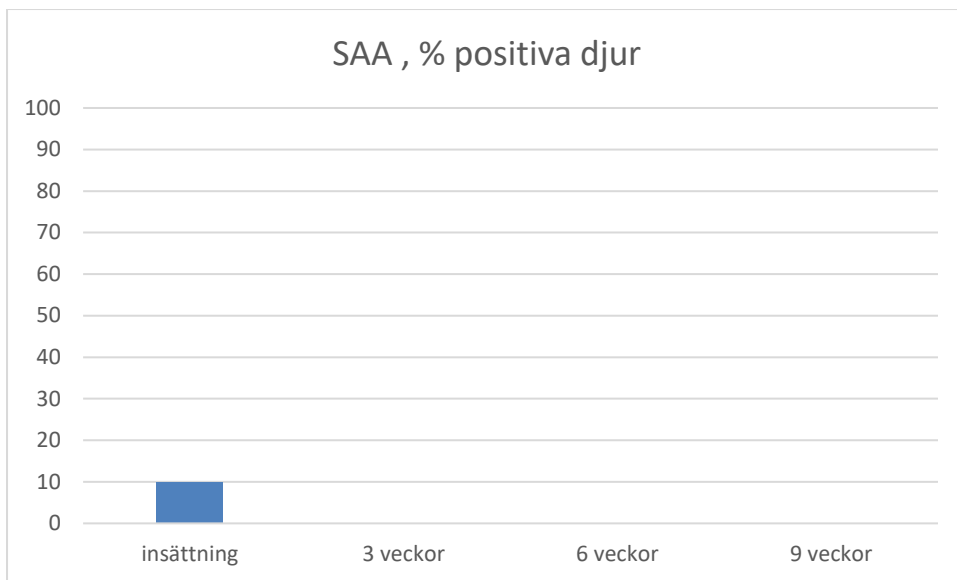
Ett djur var klart seropositiv mot M hyo vid ankomsten, men absorbansnivån sjönk under hela uppfödningstiden. Ett annat djur serokonverterade mot M hyo 6 veckor efter ankomsten. Övriga åtta grisar förblev seronegativa mot M hyo under uppfödningstiden.

Samtliga grisar var seronegativa mot App serotyp 3, liksom mot Influensa A under hela uppfödningstiden (Se figur 4).



Figur 4. Genomsnittliga absorbansnivåer av antikroppar mot olika mikroorganismer. Gränsvärdet för positiv reaktion var 0,4 för M hyo, 0,6 för H parasuis och 0,5 för övriga.

Som framgår av figur 5 påvisades höga nivåer av akutfasproteinet Serumamyloid A (SAA) endast i ett av de 40 analyserade proverna (gris 312 vid ankomst; 156 $\mu\text{g/ml}$). Detta djur förblev seronegativt mot Influensa A, M hyo och App serotyp 3 under hela perioden. Grisen var under hela perioden seropositiv mot P multocida med en relativt stabil Ak-nivå över tid (1,21-1,37-1,50-1,43), liksom avseende App serotyp 2 (0,98-1,06-1,18-1,19) och vad gäller H parasuis så låg absorbansvärdena kring det positiva gränsvärdet under hela uppfödningstiden (0,55-0,69-0,73-0,59). I denna gris påvisades App 2 och P multocida endast vid de två sista provtagningsstillfällena, varför SAA-reaktionen är svår att länka till infektion med App eller med P multocida. M hyorhinis påvisades vid alla 4 tillfällen hos detta djur liksom hos många andra av djuren.



Figur 5. Andelen grisar (%) där akutfasproteinet serumamyloid A (SAA) påvisades i serum.

Diskussion och slutsatser

Olika mikrober har olika predelektionsplatser och dessutom olika förmåga att etablera sig på dessa. I den här studien bedömde vi det därför som intressant att studera om förekomsten av kända patogena mikrober i trachea (luftstrupen) varierade över tid, vilket vi motiverade med att förekomst i luftstrupen sannolikt är mer riskfylld än i näshåla/svalget eftersom ytterligare en ”skyddsspärr” då passerats. I ett tidigare projekt analyserades prover från näshålan med ny PCR-teknik, så kallad NGS (Next Generation Sequencing). I den studien hade de flesta grisarna relativt höga mängder av bakterierna *Haemophilus* och *Streptokocker*. Den studien visade också att varje besättning etablerade en specifik bakterieflora, men att denna kunde variera över tid inom besättningen (Ehlorsson m.fl 2016; Leijon m.fl 2016).

Resultaten i denna studie visade att *M. hyorhinis* var ett vanligt fynd i trachea under hela slaktgrisperioden. App serotyp 2 påvisades hos 50 % av grisarna i samband med insättningen. Därefter sjönk förekomsten till noll för att stiga mot slutet av uppfödningen till mellan 70 och 90 %. *P. multocida* var vanligt fynd under slutet av uppfödningensperioden och kunde då påvisas hos 50 till 80 % av grisarna. Det frekventa påvisandet av *M. hyorhinis* i trachealproven indikerade att djuren sannolikt exponerats för denna mikroorganism redan före flytten till slaktgrisstallarna. Däremot påvisades i princip aldrig Influensa A eller *M. hyo*.

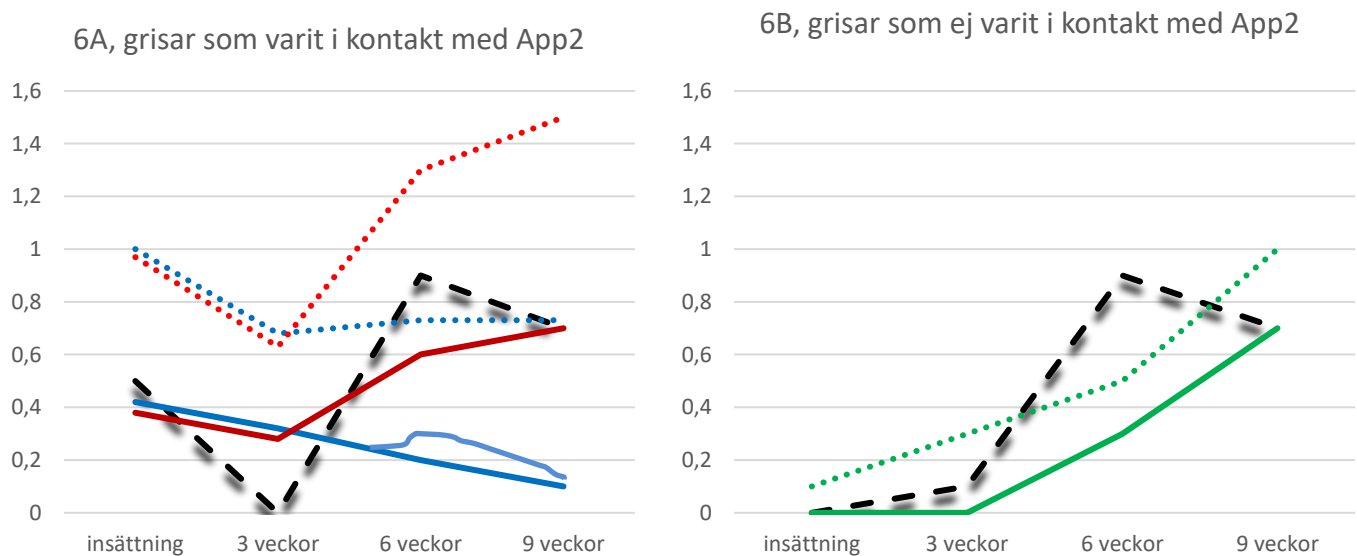
De relativt stabila serologiska resultaten konfirmerade såväl frånvaron av Influensa A och *M. hyo* som att infektionstrycket avseende App serotyp 2 och *P. multocida* i stort sett befann sig i balans under uppfödningen. Det visade även att djuren utsatts för infektioner med dessa smittämnen redan före insättningen i slaktgrisstallet. Trots detta påvisades såväl App serotyp 2 som *P. multocida* frekvent i trachealproven under slutet av uppfödningen. Ändå sjönk antikropps-nivån mot App serotyp 2, som var relativt hög vid insättningen, efter hand till en relativt låg nivå strax över gränsvärdet för positiv reaktion.

Det finns olika teorier om varför vissa infektioner bryter ut. En teori är att miljö, stress och/eller virusinfektioner kan skapa en obalans mellan kroppens försvar (i luftvägarnas slemhinna) och mikroorganismens infektionsförmåga. Slutsatsen vi drar i nuvarande studie där App serotyp 2 och *P. multocida* frekvent påvisades i trachea under slutet av uppfödningen var ändå att de lungsåcksinflammationer som registrerades i samband med slakt troligen till stor del orsakats av infektioner med främst App serotyp 2 tidigt under uppfödningen och troligen efterföljt av sekundära *P. multocida*-infektioner. Denna hypotes stöddes även av USK, eftersom de registrerade lungskadorna vid slakt aldrig var av akut karaktär. De var i samtliga fall av kronisk karaktär och de hade endast en relativt ringa utbredning (Se figur 6).

Trots detta måste de frekventa fynden av App serotyp 2 och *P. multocida* i trachea sent under uppfödningen beaktas. Det förefaller som om dessa djur som redan tidigare exponerats för de aktuella mikroorganismerna förvärvat en

funktionell immunitet mot dem. Djuren uppvisade därmed inga kliniska tecken på sjukdom, vilket styrktes av att de bibehöll en hög tillväxttakt. Infektionerna sent under uppfödningen förorsakade således varken klinisk sjukdom eller nedsatt tillväxt. Enligt USK var de flesta lungskadorna sannolikt 1–2 månader gamla och därmed var troligen åtminstone en del av dem troligen förvärvade efter insättningen. Trachealfyndet antyder i så fall att djuren infekterats 6 veckor före slakt eller mindre. Förutsatt att grisarna förvärvat en funktionell immunitet mot infektionerna så bekämpas den nya infektionen snabbare och utan att antalet antikroppar påverkas (Sjölund m.fl. 2009) Därmed bör infektionen kunna läka snabbare än vad en primärinfektion gör, dvs infektionen bör snabbare övergå i en kronisk form (Se figur 6).

Hypotesen att grisarna utvecklade en funktionell immunitet vid reinfektion av App serotyp 2 under slutet av uppfödningen styrktes ytterligare av avsaknaden av akutfasproteinet SAA. SAA är en markör för akuta bakteriella infektioner, inklusive App serotyp 2, hos grisar med en ofullständig immunitet. Frånvaron av akutfasproteiner i serum antydde därför att djuren redan tidigare exponerats exempelvis av App serotyp 2 och att de därmed inte behövde mobilisera det ospecifika immunsvaret som initieras vid kontakt med nya infektiösa ämnen. Frånvaron av SAA stämde även väl överens med frånvaron av kliniska symtom och tillväxthämning trots den höga nivån av pleuriter som registrerades vid köttbesiktningen (se figur 6).



- Figur 6a.** Den streckade svarta linjen visar incidensen av App serotyp 2 i trachea i försöket. De blå linjerna visar hur försöksdjuren reagerade. Vid kontakten med App serotyp 2 vecka 6 och vecka 9 hade de förvärvat en funktionell immunitet mot App serotyp 2. Den prickade linjen visar nivån av antikroppar som inte ökade då djuren reexponerades för App serotyp 2. Den heldragna linjen visar hur utbredningen av lungskadorna läker av med tiden. Extrapuckeln mellan 6 och 9 veckor visar en möjlig temporär ökning av lungskadornas utbredning vid reexponeringen för App serotyp 2 och P multocida, som dock kuperas i sin utbredning och duration eftersom djuren förvärvat en funktionell immunitet. De röda linjerna visar hur djur med en ofullständig immunitet reagerar vid kontakten med App serotyp 2 vecka 6 och vecka 9. Den prickade linjen visar hur nivån av antikroppar stiger och den heldragna linjen hur utbredningen av lungskadorna ökar.

Figur 6b visar samma förlopp för grisar som varit oexponerade för App serotyp 2 och därmed utan immunitet mot den infektionen vid insättningen. Då sådana grisar exponeras för bakterien serokonverterar de samtidigt som de utvecklar lungskador (gröna linjer).

Vår bedömning i det här fallet blev därför att den höga incidensen av brösthinneinfektioner av ringa utbredning och av kronisk karaktär i den undersökta besättningen orsakades av sekundärinfekterade App serotyp 2-infektioner.

Vi vill påpeka att det även finns andra orsaker till höga pleuritnivåer i besättningar med hög tillväxt, eftersom det finns besättningar med denna typ av problematik som är fria från såväl App serotyp 2 som influensa och M hyo (Wallgren m.fl., 2016). I sådana besättningar ses dock alltid höga nivåer av antikroppar riktade mot P multocida. Vår tro är därför att mekanismerna är ungefär desamma i dessa besättningar som de som här beskrivits, men att andra mikrober är iblandade, till exempel viroser som efterföljs av sekundära infektioner med P multocida.

Ytterligare en faktor som man bör undersöka vidare är miljöns betydelse för uppkomst av pleuriter. Det är till exempel känt att flimmerhåren i bronkerna kan förlamas av för höga ammoniaknivåer i luften. Därför kan troligen även dålig luftkvalité bidra till en hög förekomst av pleuriter vid slakt i besättningar utan kliniska tecken på sjukdom.

Referenser

Ehlorsson, C-J., Wallgren, P., Sjölund, M. och Leijon M. (2016) Utredning av orsaker till ökande förekomst av luftvägsinfektioner i slaktgrisuppfödningen. Grisföretagaren nr 5 2016.

Leijon, M., Ehlorsson, C-J., Wallgren, P., Sjölund M. och Hakhverdyan M. (2016) Mikrofloran i trynet hos grisar i besättningar med luftvägsproblem. Grisföretagaren nr 7 2016.

Sjölund, M., Martín de la Fuentes, A.J., Fossum, C. och Wallgren, P. (2009) Response of pigs to a re-challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* after being treated with different antimicrobials. *Vet Rec* 164:550-555.

Wallgren, P., Nörregård, E., Molander, B., Persson, M. and Ehlorsson, C-J. (2016) Serological patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* in pig herds affected by pleuritis. *Acta Vet Scand.* 2016 Oct 4;58(1):71.

Weiss C. (2018) Effect of tracheobronchial-swabbing and other diagnostic tools on the endocrine stress response of pigs. *ESPHM*8:85.

Etiskt tillstånd: C39/14

Denna studie är finansierad av Stiftelsen Svensk Grisforskning, med kompletterande medel från Gård & Djurhälsan och från SVA.

Tillägg: Några fakta om PRDC

Exempel på några viktiga patogener i PRDC-komplexet är:

Primärpatogener:

Mykoplasma hyopneumoniae (M hyo). Mycket vanlig bland grisar över hela världen. Smygande sjukdomsförlopp, ofta subklinisk. Förebyggs genom allt in/allt ut och vaccination.

Actinobacillus pleuropneumoniae (App). Mycket vanlig bland grisar över hela världen. Sjukdomen kan vara såväl akut och alvarlig med hög dödlighet, som ha ett smygande kroniskt förlopp med förändringar som endast hittas vid slakt i form av lungsäcksinflammation.

Svininfluensa (SI). Influensavirus A. Förekommer i en del besättningar i form av akut lunginflammation. Mycket smittosam. Zoonos.

Primers:

Mykoplasma hyorhinis (M hyorhinis) Mycket vanlig bland grisar. Kan ge lung- och hjärtsäcksinflammationer, men härbärgeras även i stor utsträckning av friska djur.

Streptococcus suis (*S suis*). En bakterie som finns i många besättningar. Kan ibland även förekomma i lunginflammationer, men associeras vanligare till led- och hjärnhinneinflammationer.

Porcine respiratory coronavirus (PRCV) Ett virus som är vanligt bland yngre grisar, men sällan ensamt ger upphov till sjukdom.

Haemophilus parasuis (*H parasuis*). En bakterie som är vanlig i många grisbesättningar och oftast föreligger en balans mellan infektionstryck och immunitet. Symptom varierar från akut sjukdom som ibland är dödlig till kronisk subklinisk infektion. Lung- och hjärtsäcksinflammation. Ofta spelar miljö eller andra infektioner in i sjukdomsförloppet.

Sekundära patogener:

Pasteurella multocida (*P multocida*). Mycket vanlig bakterie med många värdjur. Behöver hjälp av andra infektiösa ämnen eller miljö för att penetrera slemhinnan, men kan när så skett ge symptom som kan vara allt från allvarlig akut sjukdom ibland med dödsfall till kroniska infektioner som är subkliniska.