



Slutrapport:

Utredning av orsaker till ökande förekomst av luftvägsinfektioner i slaktgrisuppfödningen

Carl-Johan Ehlorsson, Gård & Djurhälsan

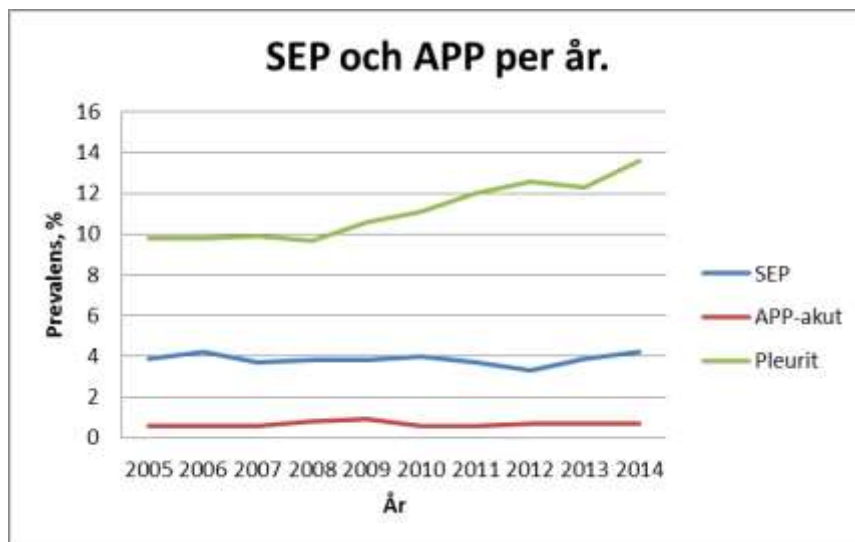
Per Wallgren, SVA

Mikael Leijon, SVA

Inledning

Problemen med luftvägsinfektioner i slaktgrisproduktionen har ändrat karaktär i takt med att besättningarna ökat i storlek. Tidigare associerades de ofta till enskilda primärpatogena infektioner, men idag är sjukdomsbilden mer komplex och relateras såväl till lindriga primära infektioner, s.k. primers, som till sekundärinfektioner. Därför talas idag ofta om PRDC – Porcine Respiratory Disease Complex. Slaktanmärkningarna har under senare år ökat i Sverige, fig 1. Enskilda besättningar kan ha problem med *Actinobacillus pleuropneumoniae* (**App**) medan andra kan ha problem med *Mycoplasma hyopneumoniae* (**Mhyo**). Dessutom kan en besättning ha en hög incidens slaktanmärkningarna utan att ha tydliga kliniska problem i uppfödningen. Det är framför allt den sistnämnda typen som är svår att åtgärda då en säker orsaksdiagnos saknas.

Kostnaderna för olika luftvägsinfektioner varierar mycket (nedsatt tillväxt, ökad foderförbrukning, längre uppfödningstid eller lägre slaktvikt etc.) och utöver detta är avdraget i slakten 20 kr/gris som fälls för brösthinneärr (kod 76). För att en gris skall registreras för pleurit (kod 76) gäller ”akut pleurit samt hårdformiga kroniska adherenser när det fibrösa ärret eller ärren har en utbredning på bröstväggen ≥ 3 cm” (SLV). För att en gris ska registreras för SEP (**Mhyo**), kod 62 skall minimiutbredningen vara måttlig pneumoni i minst 3 lunglobber eller höggradig pneumoni i en lob och för att registreras för fibrinonekrotiserande pneumoni, kod 72 (**App**) skall förändringar och lokalisation vara typiska för **App**.



Figur 1. Utvecklingen av slaktanmärkningarna för slaktgrisar i Sverige (Nationella slaktdatabasen).

Projektiden bygger på att förutsättningslöst studera sjukdomsförloppet i slaktgris-uppfödningar som har problem med luftvägsinfektioner och som identifierats i form av sjukdomsregistreringar i slakten, främst lungsåcksinflammationer. Med hjälp av ny teknik, så kallad Next Generation Sequencing (NGS), kan man förutsättningslöst leta efter infektiösa mikrober under uppfödningen. NGS är en revolutionerande teknik för att sekvensera arvsmassan (DNA/RNA) hos bland annat virus och bakterier. Genom att samtidigt studera blodparametrar och obduktioner (Utökad Slakterikontroll -USK) hoppas vi kunna få svar på vilka olika agens som är inblandade i utvecklingen av brösthinneärr. I samband med USK var det möjligt att få en noggrann granskning av förändringarna inkluderande utbredning och lokalisation vilket inte är fallet vid normalslakten. USK ger också information om förändringar som uppstått så sent i uppfödningen att de inte kan avläsas i blodet. Detta är en del av ett större projekt - **Betydelsen av byggnader och deras samspel med infektioner för den ökande incidensen luftvägsinfektioner inom grisuppfödningen** – där även Kungl. Skogs och Lantbruksakademien (SLO-fonden) är delfinansiär.

Material och metoder

I två helintegrerade grisbesättningar (besättning A i Skåne och besättning B i Uppland) följdes i två på varandra följande produktionsomgångar under 2015. Besättningarna hade under lång tid haft problem med höga slaktanmärkningar, framför allt med anmärkningar för brösthinneärr. De första omgångarna grisar i projektet sattes in i april (besättning A) och i juni (besättning B) och alla omgångarna var utslaktade i december. Besättning A vaccinerade grisarna mot PMWS och *Mhyo* medan besättning B inte vaccinerade grisarna alls. I båda besättningarna var det lite problem med luftvägsinfektioner under uppfödningstiden.

I samband med insättningen i slaktgrisavdelningen installerades mätutrustning för att följa inomhus- liksom utomhus-klimatet. I förbindelse med insättningen, 4, 8 och 12 veckor efter insättningen togs blodprov på 10 grisar i respektive omgång för analyser av blodbild (vita + dif) och serologiska analyser samt nossvabbprov från 2 av dessa grisar för NGS-analyser. I samband med slakten omhändertogs mellan 25 och 30 lungpaket/omgång som senare granskades vid Eurofins obduktionsplats i Kristianstad (USK).

Resultat

Resultaten från sjukdomsregistreringen i samband med slakt och från USK-undersökningarna redovisas i tabell 1 och 2 nedan.

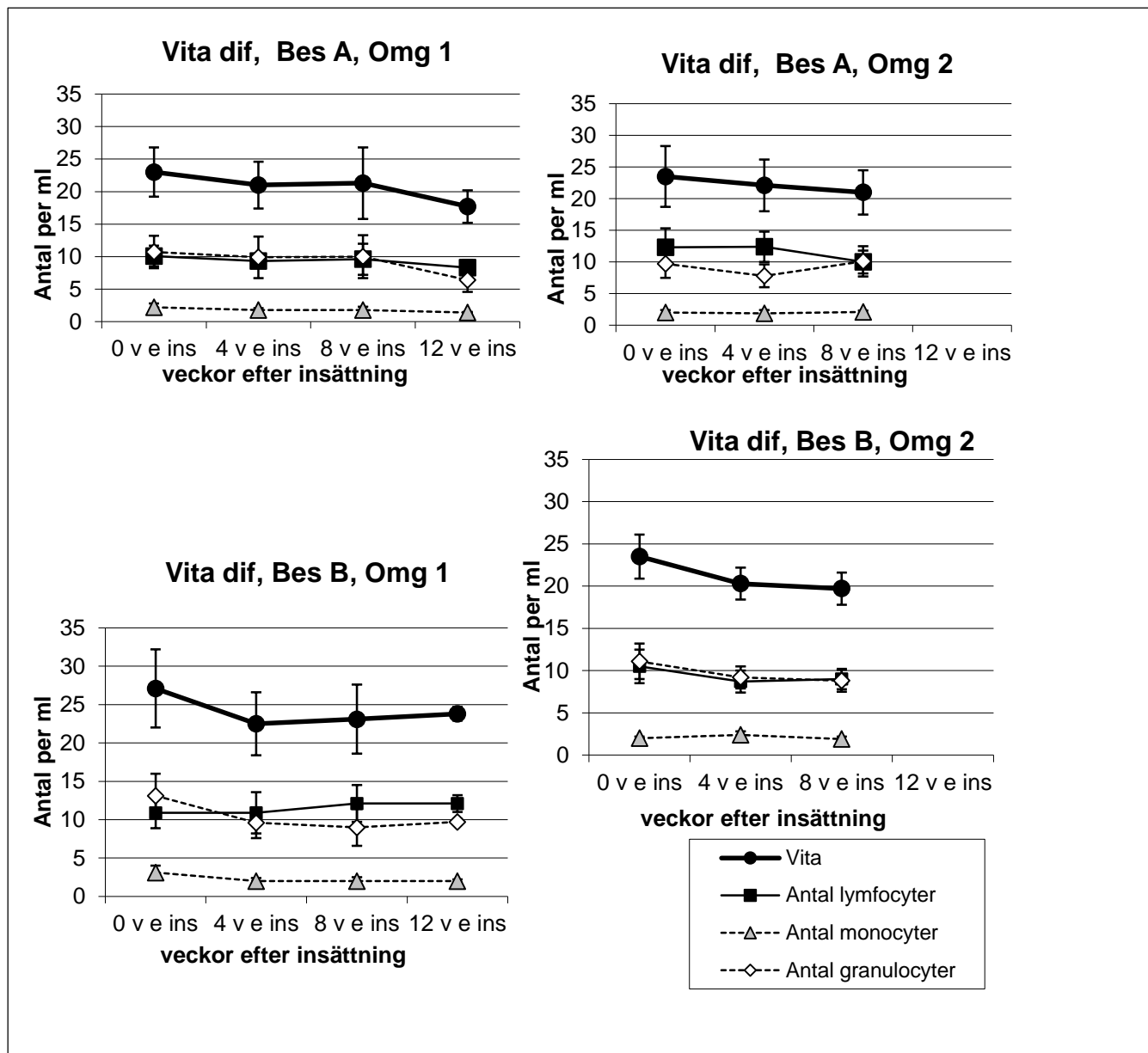
Tabell 1. Slaktanmärkningar för besättning A (Nationella slaktdatabasen) och USK-resultaten. Omgång 1 slaktad i juli 2015, omgång 2 slaktad i oktober 2015.

Omgång 1	Slaktkod 62	Slaktkod 72	Slaktkod 76
Hela omgången, 433 slaktade (totala anmärkningar) grisar	1,6 %		40,8 %
Hela skicket, 99 grisar, varifrån 25 grisar valdes till USK	1,0 %		44,4 %
25 (av 99 grisar) lungpaket till USK	Mykoplasma-relaterade förändringar	Akut pleuropneumoni	Brösthinneärr
Prevalens	72 %	4 %	48 %
Omgång 2			
Hela omgången, 432 slaktade (totala anmärkningar) grisar	0,7 %		41,5 %
Hela skicket, 74 grisar, varifrån 33 grisar valdes till USK	2,7 %		35,1 %
33 (av 74 grisar) lungpaket till USK	Mykoplasma-relaterade förändringar		Brösthinneärr
Prevalens	30 %		27 %

Tabell 2. Slaktanmärkningar för besättning B och USK-resultaten. Omgång 1 slaktad i augusti 2015 och omgång 2 slaktad i november 2015.

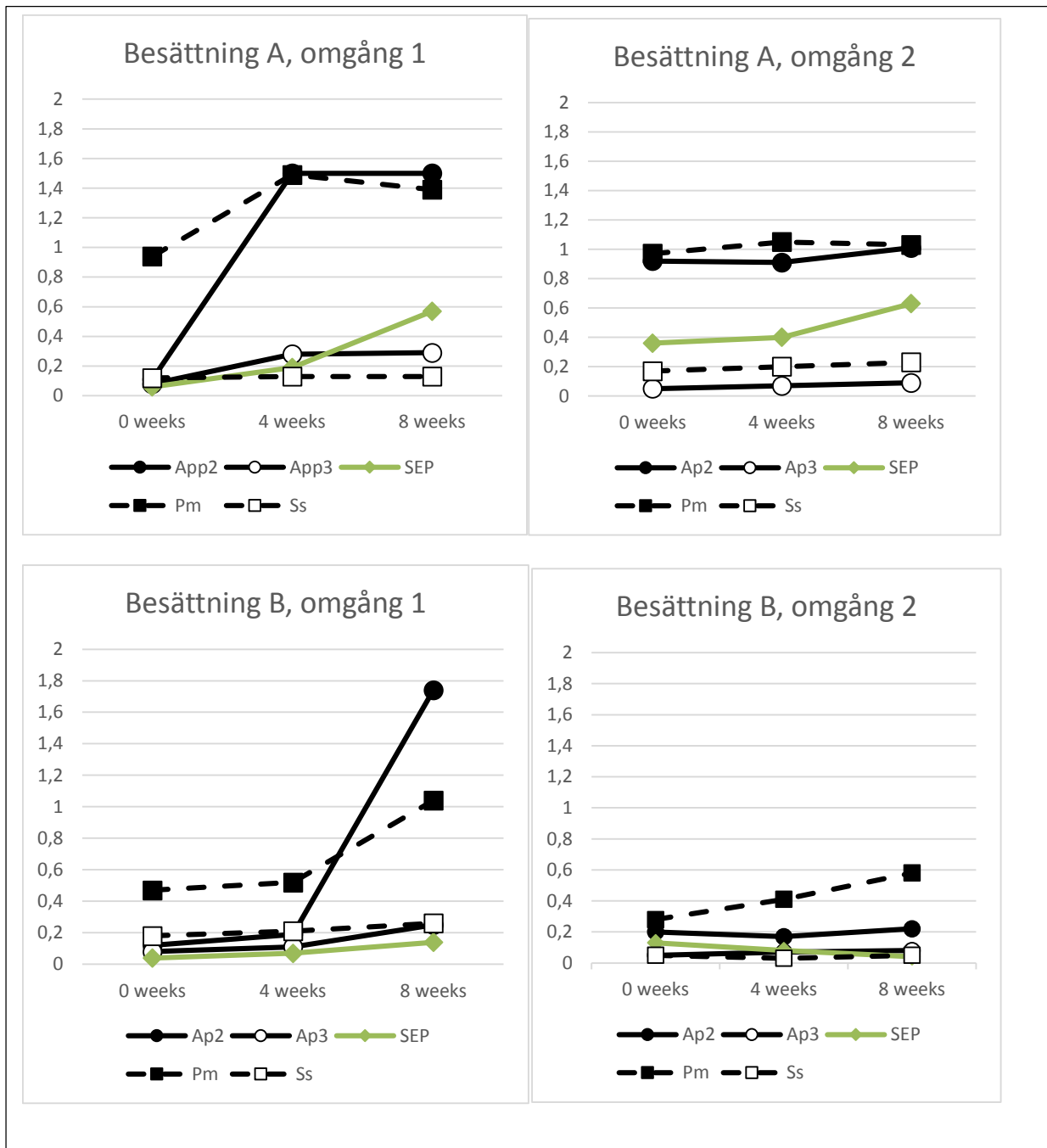
Omgång 1	Slaktkod 62	Slaktkod 72	Slaktkod 76
Hela omgången, 172 slaktade (totala anmärkningar) grisar	1,7 %	5,2 %	28,5 %
Hela skicket, 84 grisar, varifrån 26 grisar valdes till USK	2,5 %	0 %	20,2 %
26 (av 84 grisar) lungpaket till USK	USK – mykoplasma-relaterade förändringar	Akut pleuropneumoni	USK – brösthinne-ärr
Prevalens	65 %	4 %	38 %
Omgång 2			
Hela omgången, 181 slaktade (totala anmärkningar) grisar	3,3 %	12,7 %	17,1 %
Hela skicket, 35 grisar, varifrån 26 grisar valdes till USK	0 %	5,9 %	20 %
26 (av 35 grisar) lungpaket till USK	USK – mykoplasma-relaterade förändringar	Akut pleuropneumoni	USK - brösthinneärr
Prevalens	12 %	12 %	15 %

Resultaten från undersökningarna i blod redovisas i figur 2 och 3 nedan.



Figur 2. Blodanalyser för de 4 omgångarna. Vita blodkroppar varierade mellan 23,5 och 27,1x10⁹ per liter vid insättningen och sjönk till 19,7-23,1x10⁹ efter 8 veckor.

(Normalvärde för vita blodkroppar (leukocyter) är 11,6-32x10⁹/L, för lymfocyter 3,6x10⁹/L och för monocyter 0-4,9x10⁹/L, Diseases of Swine, seventh edition).



Figur 3. Resultat av de serologiska analyserna, $OD \geq 0,5$ är positivt. Belastningen av patogena bakterier varierade över tiden. Det förelåg en tydlig påverkan av *Pasteurella multocida* (**Pm**) i båda besättningarna. Antikroppar riktade mot *Streptococcus suis* (**Ss**) har inte påvisats.

I besättning A var grisarna i omgång 1 seropositiva för **Pm** vid insättningen och de blev seropositiva för **App2** veckorna efter insättningen. I den andra omgången var de seropositiva för både **Pm** och **App2** redan vid insättningen. De blev seropositiva för **Mhyo** (SEP) i båda omgångarna efter 4 veckor.

I besättning B blev grisarna seropositiva för **Pm** och **App2** efter 4 veckor i den första omgången. I omgång 2 blev grisarna endast svagt positiva för **Pm** efter 4 veckor.

NGS - Bioinformatik

Alla sekvens-läsningar från varje experiment jämfördes med NCBI:s nr-databas med hjälp av BLAST-algoritmen såsom implementerat i programmet DIAMOND. De BLAST-tabeller som producerades av DIAMOND importerades i programmet Metagenome Analyzer 5 (MEGAN) som användes för taxonomisk klassificering och grafisk illustrering. Se även figr 4 A-H nedan för detaljer.

Summering av resultaten för bakterier:

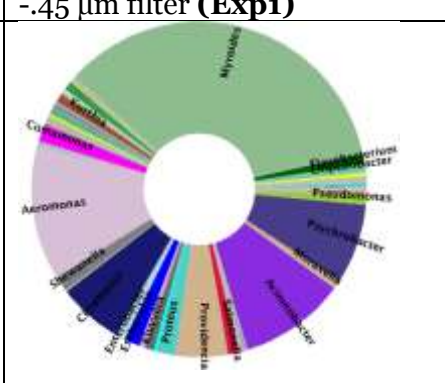
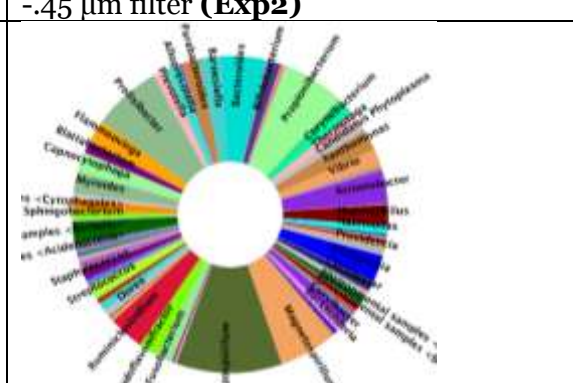
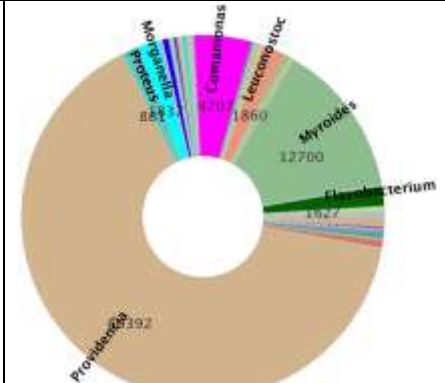
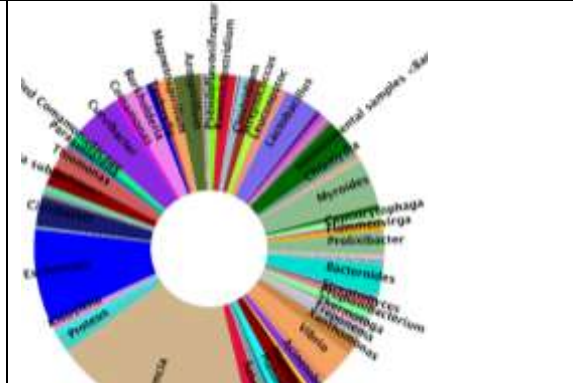
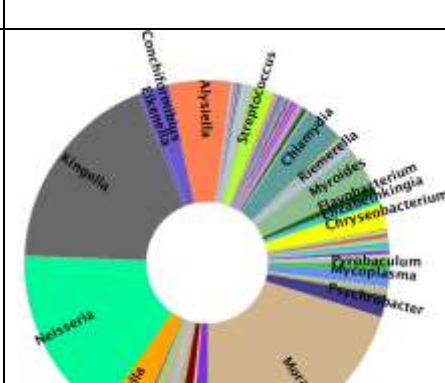
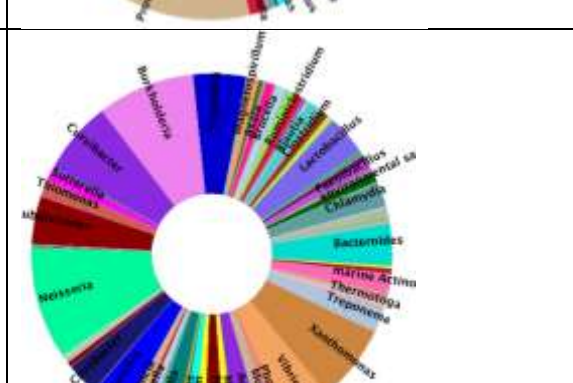
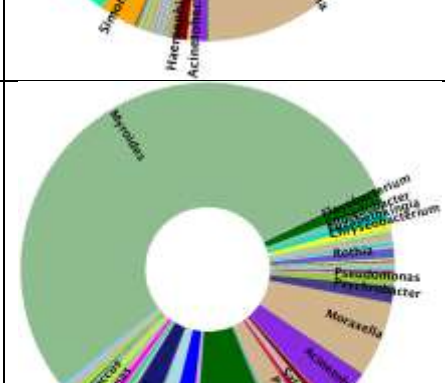
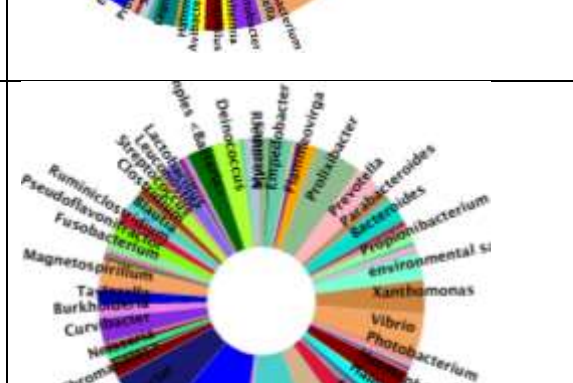
- Man kan anse att i exp1 är tårtbitarnas storlek proportionell mot populationernas storlek av olika bakterie-genus. Exp2 innehåller ett RT-steg som reflekterar i vilken grad olika bakterie-genus gener uttrycks. Det är slående att resultaten för exp1 och exp2 skiljer sig mycket åt. En förklaring kan vara att trynet slumpmässigt tillförs mycket bakteriematerial från miljön (föda, bökande etc) som bara delvis kan replikera. Detta skulle också förklara att resultaten för exp1 slår mycket från måttillfälle till måttillfälle.
- Bakteriefloren vid insättningen skiljer markant från den som senare inträder.
- Det är också slående att bakteriefloren verkar utvecklas till en liknande stabil populationsjämvikt för båda grisarna från samma besättning, men att denna populationsjämvikt skildes åt de två besättningarna emellan. Detta är tydligast för exp2 (som betonar vilka gener som uttrycks).
- Om man tittar på exp1 är tendensen att de dominerande bakterierna är från *Moraxella*. Det är notabelt att *Moraxella* är känt för att åstadkomma luftvägsproblem inklusive lunginflammation hos människa.
- I exp2 dominerade *Acinetobacter*, *Bacteriodes* och *Chlamydia* i besättning B. I besättning A var dock dominansen från enskilda genus mindre tydlig.

Summering av resultaten för virus:

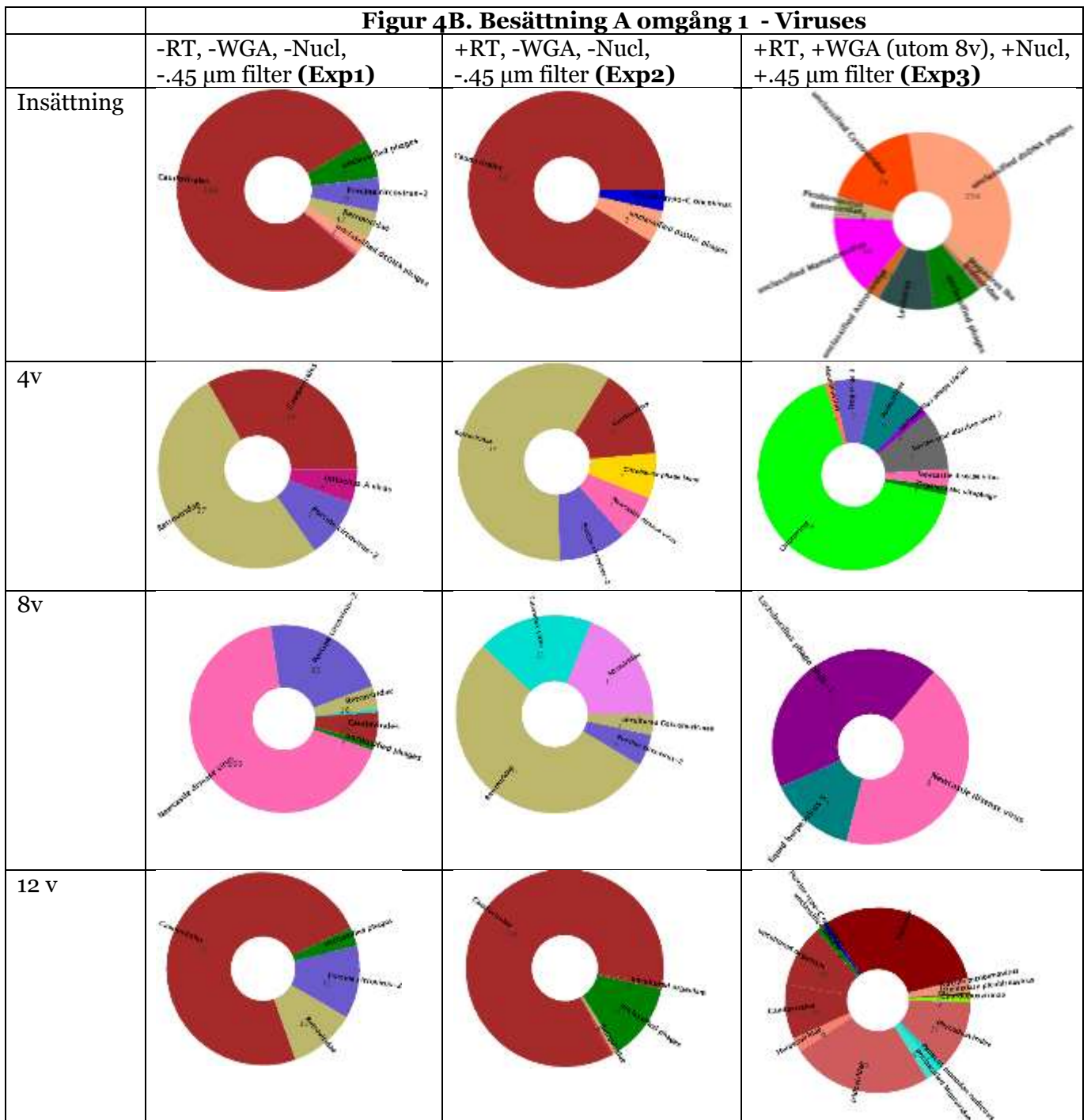
- Alla grisar uppvisar träffar till **porcint circovirus-2**.
- Alla grisar uppvisar träffar till **porcint astrovirus** i vissa fall många reads.
- Alla grisar uppvisar träffar till **picobirnavirus**.
- I ett fall detekteras träff till **porcint torovirus**.

Next Generation Sequencing (NGS)

Figur 4A. Besättning A omgång 1 - Bacteria

	-RT, -WGA, -Nucl, -.45 µm filter (Exp1)	+RT, -WGA, -Nucl, -.45 µm filter (Exp2)
Insättning		
4v		
8v		
12 v		

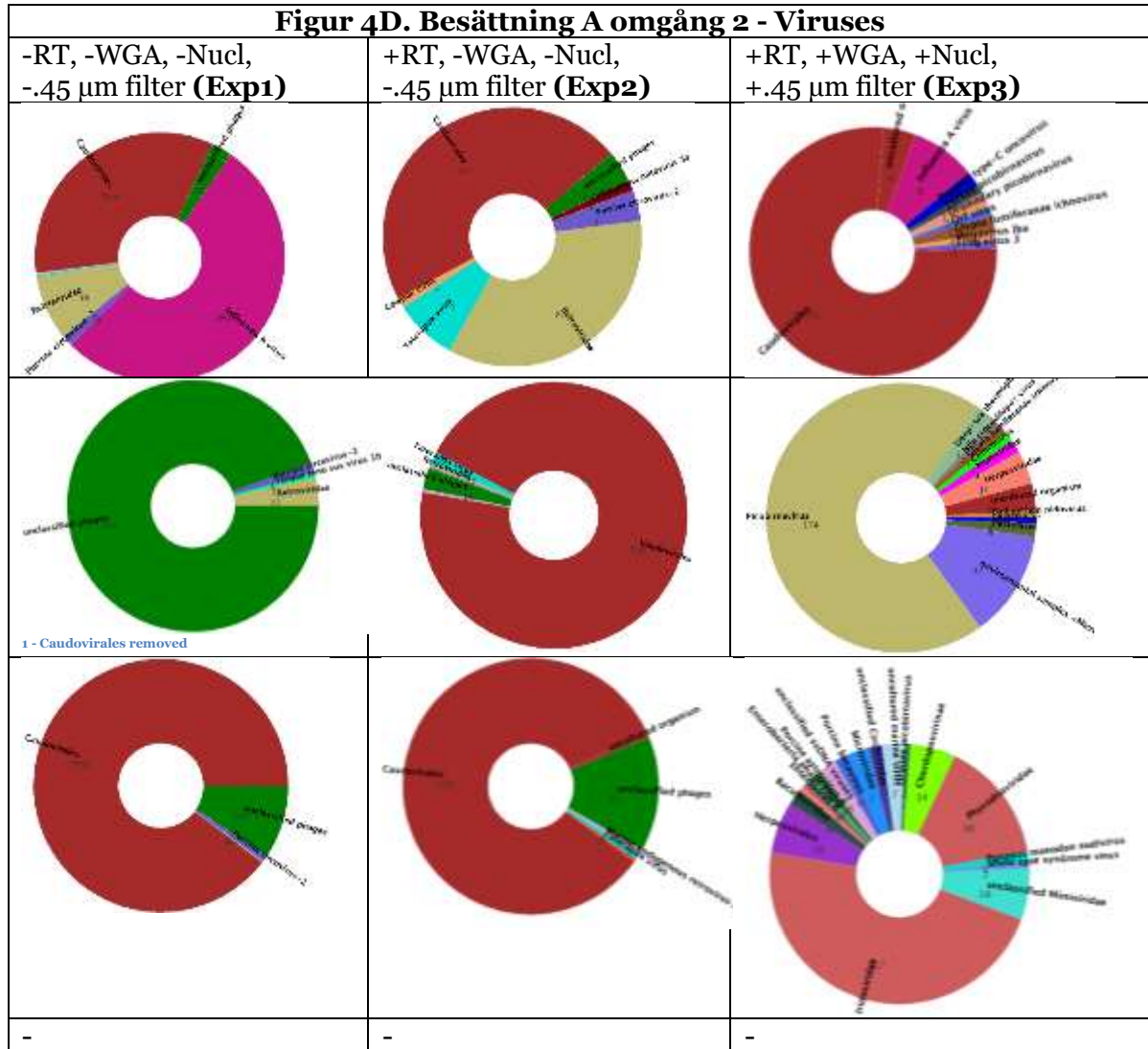
Figur 4B. Besättning A omgång 1 - Viruses



Figur 4C. Besättning A omgång 2 - Bacteria

	Figur 4C. Besättning A omgång 2 - Bacteria	
	-RT, -WGA, -Nucl, -.45 µm filter (Exp1)	+RT, -WGA, -Nucl, -.45 µm filter (Exp2)
Insättning		
4v		
8v		
12 v	-	-

Figur 4D. Besättning A omgång 2 - Viruses



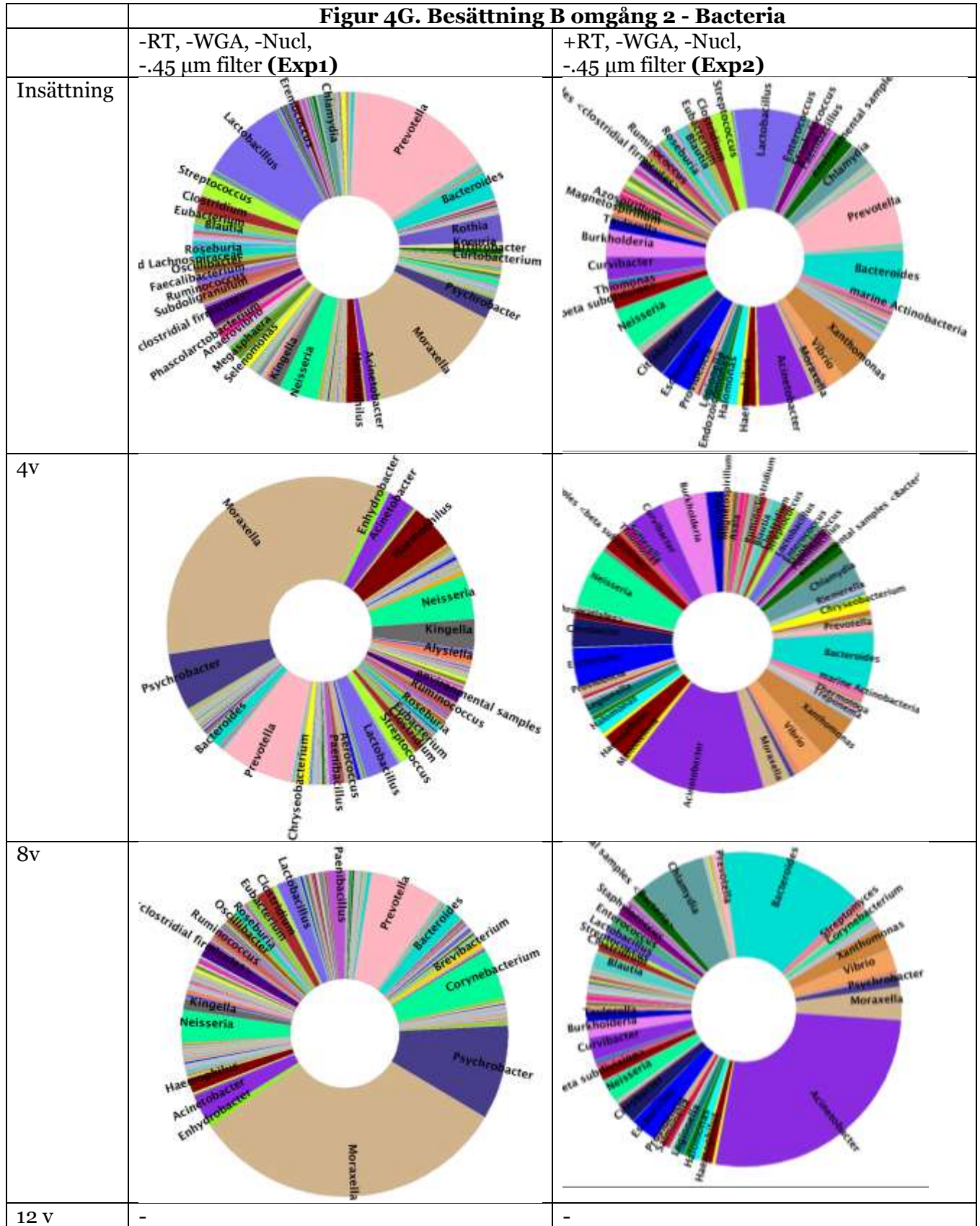
Figur 4E. Besättning B omgång 1 - Bacteria

	-RT, -WGA, -Nucl, -.45 µm filter (Exp1)	+RT, -WGA, -Nucl, -.45 µm filter (Exp2)
Insättning		
4v		
8v		
12 v	-	-

Figur 4F. Besättning B omgång 1 - Viruses

	Figur 4F. Besättning B omgång 1 - Viruses		
	-RT, -WGA, -Nucl, -.45 µm filter (Exp1)	+RT, -WGA, -Nucl, -.45 µm filter (Exp2)	+RT, +WGA, +Nucl, +.45 µm filter (Exp3)
Insättnin g			
4v			Failed
8v			Failed
12 v	-	-	-

Figur 4G. Besättning B omgång 2 - Bacteria



Figur 4H. Besättning B omgång 2 - Viruses			
	-RT, -WGA, -Nucl, -.45 µm filter (Exp1)	+RT, -WGA, -Nucl, -.45 µm filter (Exp2)	+RT, +WGA, +Nucl, +.45 µm filter (Exp3)
Insättnin g			
4v			Failed
8v			
12 v	-	-	-

Figur 2 A-H. **NGS-analyser.**

Exp1: Ingen .45 µm-filtrering. DNA-extraktion (Qiagen). Inget reverse transcription (RT)-steg. Ingen amplifiering, ingen nukleasbehandling. Protokollet optimerat för maximal återvinning av bakteriellt DNA. Bör också ta med DNA-virus.

Exp2: Som Exp1 men med Trizol-extraktion optimerat för RNA och med RT steg. Protokoll optimerat för bakteriella gener under expression och RNA-virus.

Exp3: Trizol-extraktion, .45 µm filtrering, RT-steg, whole genome amplification (WGA) för vissa prover, nukleasbehandling. Protokoll optimerat för RNA-virus.

Diskussion

Serologin visade på en utveckling för flera infektions-agens, trots att det kliniskt inte varit några utbrott av luftvägsinfektioner under uppfödningen i besättningarna. Det är dålig överensstämmelse mellan sjukdomsregistreringen vid slakt och USK avseende de mykoplasma-liknande förändringarna. Orsaken är troligen att utbredningen varit mindre än gränsen för registrering i slakt. Ärr-bildningarna samt serologin för **Pm** talar för en äldre infektion.

I besättning A var antalet vita blodkroppar relativt högt vid insättningen (dock inom normalvärdet) och sjönk därefter under hela uppfödningstiden trots att grisarna genomgick infektioner med **Pm**, **App2** och **Mhyo**. Detta talar för att infektionstrycket sjunkit under uppfödningstiden och i så fall kan andra infektioner tidigt i grisens liv ha haft betydelse för de ärr som noterats på lungorna i USK. I besättning A förekom **Pm** i båda omgångarna (sommar och höst) och grisarna var serologiskt positiva redan vid insättningen. Antikroppar mot **App2** förekom också redan från tidig ålder. **Pm** anses kunna ge akuta lunginflammationer men betraktas oftast som en "secondary invader", vilket betyder att någon annan mikroorganism skapar en inkörsport. Vanligtvis anses virus vara sådana "dörröppnare". Även **Mhyo** räknas som en "dörröppnare", men i detta fall kom den serologiska responsen mot **Mhyo** först i slutet av uppfödningen varför **Mhyo** inte bedömts vara den viktigaste inkörsporten. Dessutom var grisarna i besättning A vaccinerade mot **Mhyo**. De ärr som noterades i USK-rapporten kan naturligtvis ha orsakats av en tidigare infektion med **Mhyo**, men de serologiska analyserna motsäger detta. De kan också ha härrört från virala infektioner, eftersom virusinfektioner i luftvägssystemet har samma predilektionsställen som **Mhyo**. Resultaten från NGS-undersökningarna är därmed högtintressanta. I NGS-analyserna påvisades bland annat porcint circovirus, porcint astrovirus, picobirnavirus och porcint torovirus. Även influensa A (AIV) och Newcastle Disease Virus (NDV) påvisades.

I besättning B visade serologin i båda omgångarna att grisarna var negativa mot de undersökta mikroberna vid insättningen, men efter 4 och 8 veckor sågs en reaktion mot i första hand **Pm**, men även **App2** i omg 1. Detta stämde väl överens med fynden vid slakt där det registrerades akuta förändringar av **App** samt brösthinneärr och detta sågs även vid USK-undersökningarna. I serologin sågs ingen reaktion mot **Mhyo**, men vid USK fanns det som betecknas som mykoplasma-relaterade förändringar i mer än hälften av lungorna. Dessa registreras inte i samma utsträckning vid slakt på grund av skillnader i kriterierna för bedömningen. Vid NGS sågs en utveckling av bakteriefloran mot en mindre diversitet och på virus sidan påvisades PCV2 under hela uppfödningstiden, liksom caudo- och retrovirus.

Fler analyser med NGS skulle naturligtvis givit en ännu bättre bild av de olika infektioner som kan vara inblandade i luftvägssjukdomskomplexet, men det var inte ekonomiskt genomförbart att göra fler NGS-undersökningar. Därutöver skall miljömätningarna vägas in vilket inte ingår i denna del men som kommer att bearbetas inom ramen för den del av projektet som finansieras av SLO-fonden vid KSLA.

Resultaten tyder på att infektioner tidigt i livet (under diperioden och tillväxtperioden) kan ha stor betydelse för de skador som syns på lungvävnaden i samband med slakt. Vidare antyder resultaten att infektionsbilden kan skilja avsevärt mellan olika besättningar trots att de har en liknande sjukdomsbild. Att aktivt arbeta med att identifiera infektionsämnen och infektionsmönster i besättningar med luftvägsproblem förefaller därmed att bli allt viktigare för att försöka komma tillrätta med problem inom detta sjukdomskomplex.

Referenser

- 1) Belák S., Karlsson O.E., Leijon M., and Granberg F., (2013) High-throughput sequencing in veterinary infection biology and diagnostics. *Rev. Sci. Tech.* 23 (3) 893-915.
- 2) Blomström A.L., Fossum C., Wallgren P., and Berg M., (2015) Viral metagenomic analysis reveals a complex co-infection situation in healthy and PMWS affected pigs. *Vir J.* submitted for publication.
- 3) Buchfink B., Xie C., Huson D.H., (2015) Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, vol. 12: 59-63.
- 4) Ehlorsson C-J., and Wallgren P., (2014) *Actinobacillus* serotype 2, vaccination with a vaccine based on the serotype. *Proc. IPVS 23 (I)*. 297.
- 5) Ehlorsson C-J., Wallgren P., and Bak H., (2010) Vaccin mot PCV2 gav bättre tillväxt och färre restgrisar (clinical effects of PCV2 vaccination). *Djurhälsonytt Nr1*, 6-7.
- 6) Huson D.H., Auch A.F., Qi J., Schuster S.C., (2007) MEGAN analysis of metagenomics data. *Genome Research* 17: 377-386.
- 7) Wallgren P., (2014) PRDC – vad är det? *Komp. Allm. Vet. Möte. 2014*. In press.
- 8) Wallgren P., Mattsson S., Persson M., and Eliasson-Selling L., (2012). Pleuritis in herds with low levels of antibodies to *Actinobacillus*. *Proc. IPVS 22: I (oral)*, 266.
- 9) Wallgren P., Lundeheim N., and Ehlorsson C-J., (2011) Friska grisar – lönsamma och miljövänliga. *Svensk VetTidn.* 63 (5) 15-22.
- 10) Zoric M., Sahlander P., Mattsson P.A., Johansson S.E., Johansson M., and Wallgren P., (2011) Ny design av stallbyggnader för växande grisar som kan öka djurens välfärd och reducera energikostnaderna med bibehållen produktivitet. I. *Vintertid. Svensk VetTidn.* 63 (3) 19-28.
- 11) Zoric M., Sahlander P., Mattsson P.A., Johansson S.E., Johansson M., and Wallgren P., (2012) Ny design av stallbyggnader för växande grisar som kan öka djurens välfärd och reducera energikostnaderna med bibehållen produktivitet. II. *Sommartid. Svensk VetTidn.* 64 (1) 11-21.
- 12) Wallgren P., Nörregård E., Molander B., Persson M. and Ehlorsson C-J., (2016) Different disease patterns in pig herds affected by pleuritis. *Acta Vet Scand.* Submitted for publication.