

## Spädgrisdiarré -

### Ett nygammalt och allvarligt problem i moderna grisbesättningar.

Projektnr H1050154

Rapportens författare: Magdalena Jacobson

#### Hypotes 1

- Spädgrisdiarrén orsakas av "gamla" mikroorganismer men förändringar hos bakteriestammen, i grisarnas immunstatus och/eller smittryck i besättningarna har banat väg för sjukdomsutbrott, trots gängse förebyggande rutiner.

*Alternativt*

#### Hypotes 2

- Spädgrisdiarrén orsakas av "nya" mikroorganismer som har etablerat sig i den moderna grisproduktionen.

### Bakgrund och frågeställning

Spädgrisdiarré beskrevs redan på 1950-talet. I Sverige har sjukdomen vanligen förknippats med specifika stammar av bakterien *Escherichia (E.) coli*, så kallade ETEC (Enterotoxinproducerande *E. coli*). I vissa delar av landet är även bakterien *Clostridium (C.) perfringens* typ C, en känd orsak till spädgrisdiarré.

I litteraturen anges dessutom ytterligare orsaker såsom rotavirus, coronavirus, *C. perfringens* typ A, coccidier, *C. difficile*, *Cryptosporidium parvum*-infektion, och *Strongyloides* spp. Utöver detta finns också andra bakterier och virus, som har påvisats hos svenska grisar men vars betydelse är okänd. Som exempel kan nämnas reovirus, enteropatogena *E. coli* (EPEC) och torque teno-virus. Vissa miljöfaktorer såsom omgivningstemperatur anses också ha stor betydelse. Förändringar i miljö eller skötselrutiner kan öka smittrycket eller påverka spädgrisens möjligheter att få i sig en adekvat mängd råmjölk. Nya stammar av *E. coli* kan också etablerats, mot vilka de nuvarande vaccinerna inte har effekt.

Tack vare hittills effektiva vaccin har spädgrisdiarré varit nästintill försvunnen under många år. På senare år har dock rapporter från fält indikerat att spädgrisdiarré, trots väl fungerande skötsel- och vaccinationsrutiner, blivit ett allt vanligare problem. Orsaken till detta är okänd. Drabbade besättningar har ofta en hög och effektiv produktion, ett gott smittskydd och en god skötsel. Trots detta kan spädgrisdödligheten uppgå till 27 % och behandlingsjournalerna visar, att en del besättningar rutinmässigt behandlar upp till 70 % av spädgrisarna med antibiotika. Vidare har traditionella behandlingar av denna nya form av sjukdomen ofta dåligt resultat och många besättningar anger att enrofloxacin är den enda fungerande behandlingen, vilket är mycket alarmerande ur resistenssynpunkt. Internationella rapporter visar, att liknande sjukdomsproblem även finns i t.ex. Danmark och Frankrike.

## Material och metoder

### *Djur och besättningar*

Projektet har genomförts inom ramen för ett fyraårigt doktorandprojekt där det fjärde året finansierats av SLU.

Etiskt tillstånd har erhållits från Uppsala försöksdjursetiska nämnd (dnr C120/11).

Med hjälp av Svenska djurhälsovården identifierades 10 besättningar med typiska problem. Besättningarna var lokaliserade i Uppland, Södermanland och Västmanland, för att säkerställa en rimlig transporttid och god kvalitet av resultaten vid obduktion. Samtliga besättningar vaccinerade rutinmässigt mot ”klassisk” ETEC. Varje besättning besöktes av två veterinärer (försöksledare samt doktorand), och en enklare miljömätning (hygien på boxgolv, omgivningstemperatur samt temperatur på grisarnas liggyta) genomfördes. Från varje besättning köptes sju grisar in, totalt 70 grisar. Veterinär i samarbete med djurägare ansvarade för urvalet av fem grisar med typiska symptom på spädgrisdiarré samt två kliniskt friska kontrollgrisar. Samtliga grisar skulle vara yngre än en vecka, sjuka grisar skulle ha utvecklat diarré samma dygn, och ingen skulle ha behandlats med antibiotika. Utvalda grisar genomgick en klinisk undersökning och deras rektaltemperatur mättes.

I samband med diarrésjukdomar uppstår skador på tarmslemhinnan som ofta är mycket karakteristiska. Det första steget i studien var därför att identifiera och beskriva förändringarna i tarmvävnaden. Eftersom nedbrytningen av tarmvävnad med åtföljande bakterie-överväxt ger synliga förändringar redan 15 minuter *post mortem* är det nödvändigt med en snabb obduktion och provtagning. Grisarna transporterades in levande till avdelningen för patologi, SLU, i en därför avsedd transportlåda. Ett blodprov togs vid ankomsten, varefter djuren avlivades och obducerades. I samband med obduktionen togs prover ut för histologi och bakteriologi.

### *Hematologi*

Blodproven centrifugerades och serum frystes i  $-70^{\circ}\text{C}$ . Totalprotein-koncentrationen bestämdes (Architect c4000 system, Abbot Laboratories) och serumproteiner bestämdes med gelelektrofores (Sebia Hydrasys LC, Issy-les-Moulineaux, France) enligt standardmetod. Sex proteinfraktioner; albumin,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, och  $\gamma$ -globuliner, bestämdes med hjälp av en laserdensitometer (Sebia Hyrys2, Sebia, Issy-les-Moulineaux, France).

### *Patologi och parasitologi*

Vävnadsprov togs standardiserat från duodenum, proximala och distala jejunum, ileum, caecum, samt proximala och distala colon. Prov togs dessutom från eventuella, makroskopiskt synliga förändringar. Vävnaden fixerades i 10 % buffrad formalin i 24 timmar. Vävnadsprov från samtliga tarmavsnitt frystes även omedelbart i flytande kväve för att senare prepareras för analys med PCR, och resterande tarmpaket frystes i  $-70^{\circ}\text{C}$  när provtagningen avslutats. Den fixerade vävnaden bäddades i paraffin, snittades i  $4\ \mu\text{m}$  tjocka snitt och färgades med haematoxylin och eosin (HE). Från åtta grisar färgades snitt från tunntarmen även med modifierad Brown & Brenn Gramfärgning för mikroorganismer. Samtliga snitt undersöktes under ljusmikroskop av en person som var blindad för djurens hälsostatus. Förhållandet villus:kryptlängd bedömdes för samtliga tunntarmssegment hos samtliga djur. Förekomst av coccidier i vävnaden bedömdes i HE-färgning. Snitt från två grisar med diarré och en kontrollgris per besättning färgades dessutom för immunohistokemi avseende detektion av *Klamydia* spp. (Dako Autostainer Plus) med en mus-monoklonal antikropp riktad mot *Klamydia* klon ACI (Progen Biotechnik) och med ett känt positivt prov som kontroll.

## *Bakteriologi*

Prov för bakteriologisk odling togs med en bomullstogs som omedelbart stoppades i Amies kolade transportmedium (Copan) för att säkerställa bakterieväxt. Samtliga prov primärodlades inom 8 h. Prov för *Escherichia (E.) coli* och *Clostridium (C.) perfringens* togs från distala jejunum och rectum, och prov för *Clostridium difficile* togs från proximala colon och rectum.

Culturetter för analys av *E.coli* ströks på 5 % blodagar-plattor och bromkresolpurpurlaktos-agar (SVA, Uppsala), inkuberades aerobt vid 37°C i 12-24 h, och två kolonier per prov renodlades och frystes i -20°C. Kolonierna analyserades senare med konventionell PCR avseende förekomst av 8 virulensgener (sjukdomsframkallande gener) som associeras med ETEC. Totalt analyserades 276 isolat (fyra per gris).

Culturetter för analys av *C. perfringens* ströks på fastidious anaerobe agar med tillsats av 5 % hästblod, och inkuberades anaerobt vid 37°C i 24-48 h. Växt bedömdes som positiv om minst ett provtagningsställe uppvisade moderat eller riklig växt av lecitinasproducerande, typiska kolonier med en typisk mikromorfologi. Culturetter odlades även i buljong (FAB; LabM) som värmdes till 65°C i 30 minuter för sporselektion, följt av anaerob odling vid 37°C i 24 h enl. ovan. Växt efter sporselektering bedömdes enligt skalan ja/nej. Ett isolat per odling sparades vid -70°C, och från en diarré- och en kontrollgris per besättning sparades ytterligare 5 isolat från direkt-odlingarna. Från samtliga prov från jejunum som bedömdes som positiva analyserades 1-6 isolat per gris med PCR avseende förekomst av toxinerna alfa-, beta-, beta2-, epsilon-, iota- och enterotoxin. Totalt analyserades 98 isolat från grisar med diarré och 54 isolat från kontroll-grisarna.

Culturetter för analys av *C. difficile* odlades anaerobt på selektiv CCFAT-agar (SVA) vid 37°C i 48-96 h. Växt bedömdes som positiv om minst ett prov uppvisade måttlig till riklig växt av gula kolonier med karakteristiskt utseende och lukt. Ett gram av tarminnehåll inokulerades dessutom på buljong för odling av *C. difficile* och inkuberades anaerobt vid 37°C i 7-8 dagar. Buljongen upphettades därefter till 70°C i 30 minuter, centrifugerades, och pelleten ströks på CCFAT-agarplattor som analyserades avseende växt efter 48 h.

*Utökade analyser (dessa analyser var inte inkluderade i den ursprungliga ansökan och har annan finansiering, men inkluderas i rapporten eftersom de bidrar till projektets helhet).* Baserat på resultaten från de histologiska undersökningarna genomfördes ytterligare analyser avseende bakterien *Enterococcus hirae* med hjälp av finansiering från Stiftelsen Sveriges Grisproducenter. Vidare genomfördes med hjälp av finansiering från samma stiftelse analyser av ytterligare sex gener associerade med andra patotyper av *E. coli*, samt analyser med en s.k. micro-array avseende 124 olika ytterligare virulensgener.

Vidare initierades och fullföljdes ett samarbetsprojekt med sektionen för Virologi, Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap, SLU, för att kartlägga samtliga i provet förekommande virus med hjälp av så kallad metagenomik.

En utökad studie i samarbete med SVA och smittskyddsinstitutet, där även prov från slaktsvin inkluderats och analyserats med MALDI-TOF avseende olika så kallade ribotyper av *C. difficile*, har genomförts (med hjälp av finansiering från ”Ivar och Elsa Sandbergs stipendiefond” och från SVA).

Utöver detta har också en enkät distribuerats och studien genomförts i samarbete med f.d. Svenska Djurhälsovården AB, numera ”Gård- och Djurhälsan”.

### *Statistisk bearbetning*

Gammaglobulin-koncentrationen analyserades med linjär regression med hälsostatus och ålder (<1 d, 1 d, 2 d, och >2 d) som förklarande variabler. Samband mellan bakteriologi och hälsostatus analyserades med Fisher's exact test där  $P < 0.05$  bedömdes som signifikant. Analyserna gjordes i R version 2.15.3 (R Core Team, 2014).

## **Resultat**

### *Djur och besättningar*

Totalt inkluderades 50 grisar med diarré och 19 kontrollgrisar i studien (en kontrollgris uteslöts då den uppvisade diarré vid ankomst till laboratoriet). Samtliga grisar var hybrider, 45 gyltgrisar och 24 handjur, och härrörde från 60 kullar (3-7 kullar/besättning). Ingen av grisarna eller deras suggor hade behandlats med antibiotika och med ett undantag kom samtliga kontrollgrisar från kullar där ingen diarré påvisats. I en besättning förekom diarré i samtliga obehandlade kullar, men två friska individer kunde identifieras inom kullarna. Grisar med diarré hade en medianålder på 1 dygn (variation 1-6 dagar) och en medianvikt på 1,6 kg (variation 0,8-2,2 kg). Kontrollgrisarna hade en medianålder på 2 dagar (variation 1-5 dagar) och en medianvikt på 1,8 kg (variation 0,8-2,2 kg). Rektaltemperaturen varierade mellan 36,2 och 39,9°C med en median på 38,8°C hos diarrégrisarna och 39,0°C hos kontrollgrisarna. Den procentuella andelen kullar med diarré vid besöket varierade mellan 17 och 67 % per besättning (inkl. antibiotikabehandlade kullar).

Hygienen i boxarna bedömdes som procentuell andel av helt betonggolv som var blött/täckt av faeces. Totalt bedömdes 256 boxar (data saknas från 6 boxar). I 97 % av boxarna där det förekom grisar med diarré och i 95 % av boxarna med friska grisar bedömdes mindre än 20 % av ytan vara blöt/faecesförorenad. Mediantemperaturen på golvet i smågrisarnas ligghörna varierade mellan 22,4 och 33,6°C per besättning, varav tre besättningar hade en mediantemperatur på under 28°C. Inga skillnader sågs mellan boxar med friska kullar och boxar med diarrégrisar.

### *Hematologi*

Koncentrationen av  $\gamma$ -globuliner i serum var 21.8+7.7 g/L (medelvärde +SD) hos grisar med diarré, och 19.8+9.1 g/L hos kontrollgrisarna. Inga skillnader kunde påvisas vid analys med en linjär regressionsmodell inkluderande hälsostatus och ålder ( $P = 0,74$ ; Fig. 1).

**Figur 1.** Boxplot visande serum-  $\gamma$ -globuliner koncentration hos 50 grisar med diarré och 19 friska kontroller.

### Patologi och parasitologi

Med undantag för en kontrollgris, var magsäcken fylld med mjölk hos samtliga grisar. Samtliga grisar som kliniskt bedömdes ha diarré hade vattning till krämig avföring i grovtarm/ändtarm och 19 kontrollgrisar hade fast avföring. (1 kontrollgris visade sig ha diarré vid ankomsten till laboratoriet och exkluderades från försöket). De viktigaste makroskopiska patologianatomiska förändringarna hos 50 grisar med diarré och hos 19 friska kontroller är sammanfattade i Tabell 1.

**Tabell 1.**

Förändringar	Diarré		Kontroller	
	n	(%)	n	(%)
<i>Stasade blodkärl i tunntarmen<sup>a</sup></i>				
Milda förändringar	15	(30)	0	(0)
Måttliga	4	(8)	0	(0)
<i>Dilaterad tunntarm</i>				
Milda förändringar	28	(56)	3	(16)
Måttliga	2	(4)	0	(0)
<i>Dilaterad grovtarm</i>				
Milda förändringar	23	(46)	0	(0)
Måttliga	6	(12)	0	(0)
Ödem i mesocolon	22	(44)	10	(53)

<sup>a</sup> data saknas från en gris

Makroskopiska förändringar i slemhinnan kunde inte påvisas hos någon av grisarna.

De viktigaste histopatologiska förändringarna är sammanfattade i Tabell 2.

**Tabell 2**

Förändringar	Diarré		Kontroller	
	n	(%)	n	(%)
<b>Tunntarm</b>				
<i>Epitelskador<sup>b</sup></i>	13	(26)	0	(0)
<i>Villus:krypt ratio <math>\leq 3:1</math><sup>a</sup></i>	5	(10)	0	(0)
<i>Enteroadherenta kocker<sup>c</sup></i>	18	(36)	0	(0)
<i>Inflammatoriska cellinfiltrat<sup>b, d</sup></i>				
Milda	15	(30)	6	(32)
Måttliga	22	(44)	7	(37)
Grava	10	(20)	0	(0)
<b>Grovtarm</b>				
<i>Epitelskador<sup>b, e</sup></i>	7	(14)	1	(5)
<i>Inflammatoriska cellinfiltrat<sup>b, d</sup></i>				
Milda	9	(18)	5	(26)
Måttliga	1	(2)	1	(5)
Kraftiga	0	(0)	0	(0)

<sup>a</sup> Anger det lägsta värdet avseende villus:krypt ratio i tunntarmen hos individuella grisar. På grund av dålig orientering av snitten kunde ration inte bestämmas i proximala tunntarmen hos tre diarrégrisar och nio kontrollgrisar, och inte heller i distala tunntarmen hos två diarrégrisar och två kontrollgrisar.

<sup>b</sup> Värdet saknas från en diarrégris

<sup>c</sup> För detaljerad beskrivning, se Larsson et al. *J. Comp. Pathol.* 2014;151(2-3):137-47.

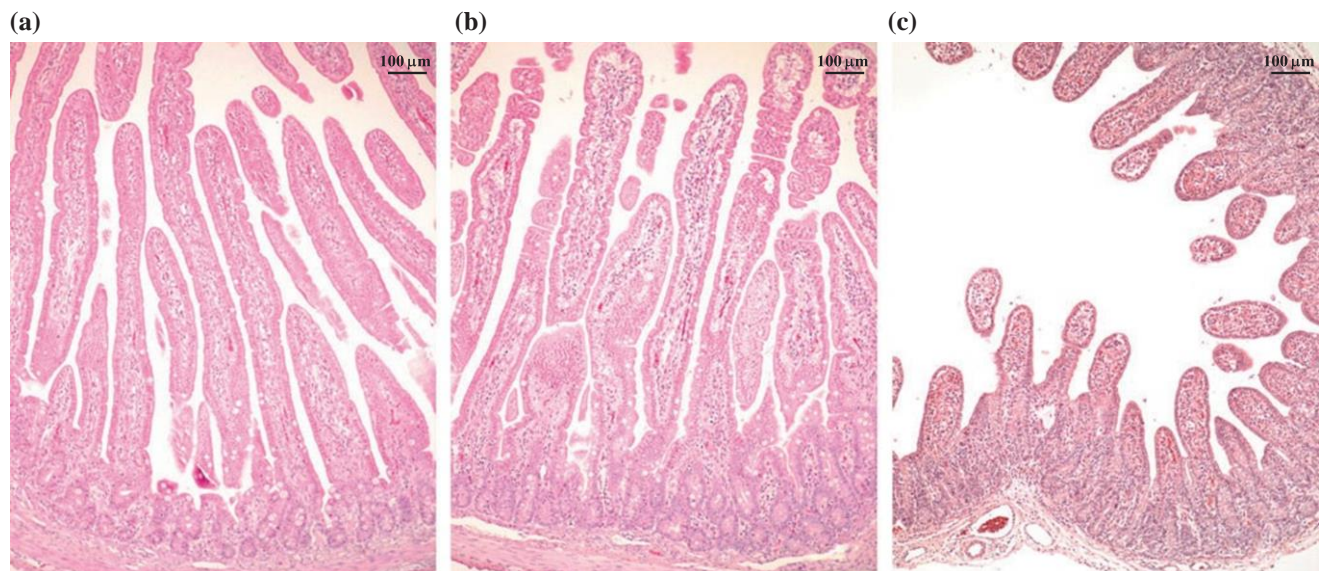
<sup>d</sup> Inflammatoriska cellinfiltrat i lamina propria bedömdes enligt skalan "mild", "måttlig" eller "grav" i varje tarmavsnitt. Ovanstående resultat representerar den högsta registrerade bedömningen i tunntarm respektive grovtarm, för varje enskild gris.

<sup>e</sup> Ej bedömd hos en kontrollgris pga dålig kvalitet på provet.

Epitelskador i villi (n=13) och villiatrofi (n=5) sågs enbart hos grisar med diarré (Fig 2). Kolonisering av tunntarmen med Grampositiva kocker sågs hos 18 grisar, varav 10 uppvisade epitelskador och 4 uppvisade villiatrofi. Dessa identifierades i en utökad studie som *E. hirae*. Epitelskadorna i tunntarmen hos tre grisar där kolonisation med *E. hirae* inte kunde påvisas var subtila och villiatrofi sågs bara i ett fall. Både diarré- och kontrollgrisar uppvisade milda till måttliga infiltrat av neutrofiler i tunntarmens lamina propria, rikligast förekommande i distala jejunum och ileum. Kraftiga infiltrat sågs hos 10 av 50 diarrégrisar men inte hos någon av kontrollgrisarna. Noteras bör, att hos sju grisar med diarré sågs dessa infiltrat enbart i anslutning till den lymfoida vävnaden i ileum, utan påvisbara epitelskador.

Hos en stor andel av grisarna med diarré (19 av 50) kunde inga eller enbart milda förändringar påvisas. Förändringarna var generellt mindre markanta hos de yngre grisarna (14 av 30 grisar yngre än 2 dagar, jämfört med 5 av 20 grisar äldre än 2 d).

Protozoer kunde inte påvisas i mucosan hos någon av grisarna.  
Klamydia spp. kunde inte påvisas i något av de undersökta snitten.



**Figur 2.**

Histologiska snitt från proximala jejunum. (a) visar normal morfologi hos en frisk kontrollgris. (b) visar relativt oförändrad tarmmorfologi hos en gris med diarré där de bakteriologiska undersökningarna inte kunde säkerställa en bakteriologisk etiologi (c) visar villiatrofi, förlängda kryptor och kubiskt epitel hos en gris med diarré som är koloniserad med *E. hirae*. (HE-färgning, bar =100 mm).

## Bakteriologi

Växt av icke-hemolyserande *E. coli* sågs i samtliga prov. Hemolyserande *E. coli* i sparsam växt hittades hos fyra grisar med diarré. ”Klassisk spädgrisdiarré”, så kallad ETEC, påvisades endast i två fall (virotyp STa/F41/F5). Övriga *E. coli* med möjlighet att uttrycka både adhesionsfaktor och toxin (AIDA/STb/ EAST-1) påvisades hos två grisar med diarré och hos en frisk kontrollgris, samtliga från olika besättningar. Två grisar med diarré och 6 kontrollgrisar bar på *E. coli* som var positiva för adhesionsfaktorn intimin men negativa avseende toxin-gener. Ett isolat vardera var positivt för adhesionsfaktorerna AIDA respektive F41 men var negativa för toxiner, 23 isolat bar på EAST-1 men var negativa avseende adhesionsfaktorer, och ett isolat var positivt för toxinet VT2e, som vanligen förknippas med ödemsjuka. De gener som specifikt kodar för så kallade enteroaggregativa *E. coli* (*aggR* och *aaiC*) kunde inte påvisas. Även virulensfaktorn *paa* undersöktes, men sekvensering av PCR-produkter från dessa analyser visade att de PCR-metoder som hittills publicerats troligen inte är specifika och *paa* kunde inte påvisas. Ett fåtal positiva reaktioner sågs i microarray-analysen men inga tydliga ”mönster” kunde urskiljas.

Måttlig till riklig växt av *Clostridium perfringens* sågs hos 51 av 69 grisar vid direktutstryk och 68 av 69 grisar var positiva efter spor-selektering. Samtliga isolat var *C. perfringens* typ A. Det fanns ingen påvisbar skillnad i bakterieväxt mellan grisar med diarré och friska kontrollgrisar. Av totalt 152 isolat bar 151 på genen för beta2-toxin. Genen för enterotoxin kunde inte påvisas.

Måttlig till riklig växt av *Clostridium difficile* sågs hos 35 av 69 grisar vid direktutstryk och samtliga 69 grisar var positiva efter spor-selektering. Grisar yngre än 2 dagar var oftare positiva vid direktutstryk jämfört med grisar äldre än 2 d (22/32 vs 13/37,  $P < 0,01$ ). Bland de grisar som var äldre än 2 d. var *C. difficile* vanligare hos kontrollerna (12/12) än hos grisarna med diarré (10/20;  $P < 0,01$ ). Hos de yngre grisarna sågs ingen skillnad i förekomst (5/7 kontrollgrisar och 8/30 grisar med diarré;  $P > 0,07$ ).

*Utökade analyser (dessa analyser var inte inkluderade i den ursprungliga ansökan och har annan finansiering, men inkluderas i rapporten eftersom de bidrar till projektets helhet).* Enteroadherenta Grampositiva kocker påvisades hos 18 grisar med diarré från sex besättningar men inte hos någon kontrollgris, och förekomsten kunde korreleras till skadorna i slemhinnan ( $P < 0,001$ ). Adhesion till slemhinnan medierad av fimbrieliknande strukturer kunde även visas med elektronmikroskopi. En fluorescerande probe konstruerades och med FISH kunde bakterierna identifieras som *Enterococcus* spp. Via sekvensering kunde dessa artbestämmas som *E. hirae* (dessa resultat är publicerade i en separat studie).

Undersökningarna av virus via metagenomik har avslutats och ett manuskript är under färdigställande. Flera troligen apatogena virus har påvisats hos både diarré- och kontrollgrisar (*Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Astroviridae*, *Circoviridae*, *Reoviridae*, *Parvoviridae* och *Picornaviridae*). Generellt demonstrerades fler virus hos kontrollgrisarna än hos diarrégrisarna, och hos de äldre (>2 d) än hos de yngre grisarna. Hos tre grisar (två diarrégrisar och en kontrollgris) från en besättning påvisades rotavirus typ A och typ C. Ett samband mellan förekomst av virus och sjukdom har inte kunnat fastställas.

*C. difficile* förekommer frekvent hos spädgrisar men förekomsten verkar minska med stigande ålder, och bakterien kunde inte påvisas hos slaktsvin. Ribotypning av isolaten visade, att de isolat som hittas hos spädgrisar inkluderar ribotyper som associeras med sjukdom hos människa i samband med antibiotikabehandlings-relaterade sjukdomstillstånd. Dessa resultat kommer att redovisas i en separat publikation.

Resultaten från enkätstudien har analyserats och en sammanställning pågår för närvarande. Dessa kommer att redovisas i en separat artikel.

## Diskussion

Det finns i dagsläget inget som talar för att den ”nya” formen av spädgrisdarré orsakas av ”gamla” mikroorganismer där förändringar i miljö eller bakteriestam skulle predisponerat för sjukdom. Tidigare kända sjukdomsframkallande orsaker kunde bara påvisas i ett fåtal fall (2 grisar var infekterade med ETEC och 3 grisar, varav en frisk kontrollgris, var infekterade med rotavirus). Nya sjukdomsframkallande ”varianter” av tidigare kända bakterier kunde bara påvisas i 3 fall (isolat av *E. coli* med andra virulensfaktorer än de som vanligen anges, hos 2 diarré- och en kontrollgris). Analys av  $\gamma$ -globuliner hos spädgrisarna visade att de fått i sig adekvata mängder antikroppar via råmjölken, även om vi naturligtvis inte kan uttala oss om specificiteten hos dessa. Det gick inte att påvisa några skillnader i hygien eller i tillgång till värme i grisarnas närmiljö mellan kullar med diarré och friska kullar. Intressant att notera i sammanhanget är dock att de två grisar som, trots att suggorna vaccinerats, ändå utvecklat ”klassisk” spädgrisdarré orsakad av ETEC, båda kom från två av de tre besättningar där temperaturerna under värmelampan bedömdes som för låga. *Clostridium perfringens* typ C kunde inte påvisas och andra undersökta arter av *Clostridium* påvisades hos samtliga grisar oberoende av hälsostatus. Ödem i mesocolon har i vissa studier angetts vara patognomont för diarré orsakad av *C. difficile*, men i denna studie kunde vi inte påvisa ett sådant samband.

Utifrån föreliggande resultat, utesluter vi därför ”Hypotes 1” ovan.

Resultaten från våra studier stödjer istället ”Hypotes 2”. Baserat på våra resultat stipulerar vi, att **spädgrisdarrén orsakas av ”nya” mikroorganismer som har etablerat sig i den moderna grisproduktionen, nämligen *Enterococcus hirae*.**

Det enda påtagliga fyndet i denna studie var ett tydligt samband ( $P < 0,001$ ) mellan förekomsten av diarré, skador i tarmen och förekomst av enteroadherenta *Enterococcus hirae*. Detta är den första studie som demonstrerar *E. hirae* som orsak till diarré hos gris. En nyligen genomförd studie i Danmark konfirmerar våra resultat. Närbesläktade arter av enterokocker (*E. durans*) har även diskuterats som orsak till spädgrisdarré i Frankrike och, i enstaka fallrapporter, avseende diarré hos andra djurslag. Hos människa är det dessutom väl känt, att vissa antibiotikaresistenta stammar av enterokocker har utvecklat mekanismer för att binda till tarmslemhinnan vilket kan leda till livshotande sjukdom.

Fortfarande finns frågetecken som inte rätats ut. Vi har påvisat *E. hirae* som orsak till diarré i 6 av 10 besättningar, men i fyra besättningar är orsaken fortfarande oklar. Det är möjligt, att grisarna även i dessa besättningar varit infekterade med *E. hirae*, men att vi misslyckats med att påvisa infektionen. Om diarrén orsakas av en infektion så är det rimligt att anta, att grisarna blir infekterade innan de utvecklar kliniska symptom. Utifrån denna hypotes var studien designad så att vi skulle ”fånga upp” djuren i tidigt skede av sjukdomen. Studier från Danmark indikerar dock, att många djur tillfrisknar spontant inom ett dygn och det är möjligt, att vissa grisar trots vår intention varit infekterade men börjat tillfriskna redan innan vi kommit ut i besättningen, och att vi därför inte kunnat identifiera orsaken. Vidare diagnosticerades sjukdomen primärt enbart med histologi. Denna metod baseras på ett 4  $\mu$ m tjockt snitt från förändrad vävnad. Eftersom det inte gick att identifiera makroskopiska förändringar i tarmens slemhinna är det möjligt, att proven tagits från fel lokalisation, speciellt om djuren provtagits i ett tidigt skede av infektionen då man kan anta att infektionen inte har hunnit breda ut sig.



Det är också möjligt, att infektionen med *E. hirae* är sekundär. Det finns i dagsläget dock inte några indikationer på detta. Vi har inte kunnat påvisa några andra infektiösa orsaker eller skador som tyder på att så skulle vara fallet. Många grisar var yngre än ett dygn när de utvecklade sjukdom. Detta skulle indikera en primär infektion redan i fosterstadiet eller under själva förlossningen, och i så fall bör misstankarna i första hand riktas mot en virusinfektion. Våra studier med metagenomik, där förekomst av samtliga virus analyseras, kunde dock inte bekräfta en sådan misstanke. Hypotetiskt skulle det även kunna finnas icke-infektiösa primära orsaker till diarré, men det finns i dagsläget ingen information om tänkbara sådana orsaker eller mekanismer hos vare sig gris eller andra djurslag.

Det har även diskuterats om en tidig, självavlökande spägrisdiarré är att betrakta som ett normalt fenomen. I en dansk longitudinell studie i fyra besättningar uppvisade 26 % av spägrisarna ”liquid faeces” någon gång under de första fem levnadsdagarna. Detta innebär, att cirka 75 % av spägrisarna inte utvecklade diarré, vilket talar emot att det skulle vara ett normalt fenomen.

Resultaten från vår studie liksom även danska och franska studier är påfallande och kan reflektera ett förändrat sjukdomsmönster avseende spägrisdiarré i Europa. Ytterligare studier behövs för att bekräfta våra resultat, och metoder för att diagnostisera sjukdomen hos det levande djuret behöver utvecklas så att studier beträffande förekomst och sjukdomsmekanismer kan genomföras.

### Publikationer

- **Larsson J**, Lindberg R, Aspán A, Grandon R, Westergren E, Jacobson M. *Neonatal piglet diarrhoea associated with enteroadherent Enterococcus hirae*. Journal of Comparative Pathology. 2014;151(2-3):137-47.
- **Larsson J**, Aspán A, Lindberg R, Grandon R, Båverud V, Fall N, Jacobson M. *Pathological and bacteriological characterization of neonatal porcine diarrhoea of uncertain aetiology*. Journal of Medical Microbiology. 2015; 64(8):916-26.
- Eriksson E, Melin L, **Larsson J**, Nörregård E, Wallgren P, Aspán A. *Neonatal piglet diarrhoea in association with presence of STb and STb:EASt-1 AIDA-positive isolates of E.coli*. Proceedings of the 22<sup>nd</sup> International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress 2012; Vol 2: 640
- **Larsson J**, Grandon R, Lindberg R, Aspán A, Jacobson M. *Neonatal porcine diarrhoea associated with small intestinal colonisation of Enterococcus spp.* Proceedings of the 5<sup>th</sup> European Symposium of Porcine Health Management (ESPHM) 2013; 148
- **Larsson J**, Aspán A, Lindberg R, Grandon R, Fall N, Jacobson M. *Pathological and bacteriological characterisation of neonatal porcine diarrhoea (NPD) with uncertain aetiology*. Proceedings of the 7<sup>th</sup> European Symposium of Porcine Health Management (ESPHM), 2015; 181

### Resultatförmedling till näringen

- Föreläsare vid Svenska djurhälsovårdens vårkonferens, Västerås, 2013. “Pågående forskning om den nya spägrisdiarrén”.
- Föreläsare vid Svenska djurhälsovårdens djurägarträff, Brunnby, 2013. “Senaste nytt om NNP”.
- Föreläsare vid Svenska djurhälsovårdens årliga veterinärträff, Eklundshof, Uppsala, 2013. “Den nya spägrisdiarrén”.

- Föreläsare på ELMIA, Jönköping 2013. "aktuellt om nya spädgrisdiarrén (NNPD)".
- Föreläsare vid veterinärmötet, Uppsala, 2014. "patologianatomiska och bakteriologiska undersökningar av spädgrisdiarré med okänd etiologi".
- Seminarium om "spädgrisdiarré orsakad av *E. hirae*". Centre of global animal diseases (CGD), VHC, Ultuna, Uppsala, 2015.
- "Framgångsrik kamp mot spädgrisdiarré på SLU", Jordbruksaktuellt nr 20, 2013.
- "Framgångsrik kamp mot spädgrisdiarré på SLU", Grisföretagaren nr 9, 2013.
- "E. coli är ingen trolig orsak till den nya spädgrisdiarrén", Grisföretagaren nr 5, 2015.
- "Kolibakterier troligen inte orsak till ny grisdiarré", ATL 2015-05-25.
- "Övåntat fynd hos nyfödda grisar med diarré", Sveriges lantbruksuniversitets forskningsnyheter nr 5, 2014.
- "Unexpected findings on New Neonatal Porcine Diarrhoea", LEARN newsletter 7, 2013.

### Posters

- "Pågående forskning vid sektionen för gris- och fjäderfämedicin", F Karlsson, J Larsson, A Sannö, A Backhans, M Jacobsson, C Fellström. LEARN conference, Lövsta, SLU, Uppsala, 2012.
- samt fakultetens forskningsdag SLU, Uppsala, 2012.
- samt Veterinärmötet, Ultuna, Uppsala, Sweden, 8-9/11- 2012.
- "Neonatal piglet diarrhoea in association with presence of STb and STb:EAST1 and AIDA-positive isolates of *E. coli*", E Eriksson, L Melin, J Larsson, E Nörregård, P Wallgren, A Aspan. 22<sup>nd</sup> IPVS Congress, Jeju, South Korea, 2012.
- "Neonatal porcine diarrhoea associated with enteroadherent *Enterococcus* spp.", J Larsson, R Grandon, R Lindberg, A Aspán, M Jacobson, 5<sup>th</sup> ESPHM, Edinburgh, UK, 2013.
- "Pathological and bacteriological characterisation of neonatal porcine diarrhoea (NPD) with uncertain aetiology" J Larsson, A Aspán, R Lindberg, R Grandon, N Fall, M Jacobson. 7<sup>th</sup> ESPHM, Nantes, France, 2015.