

**SLUTRAPPORT:**  
**Luftvägsinfektioner hos gris med särskild inriktning på**  
***Actinobacillus pleuropneumoniae***

Per Wallgren<sup>1</sup>, Caroline Fossum<sup>2</sup>, Anders Gunnarsson<sup>3</sup>,  
Anna Aspan<sup>4</sup>, Göran Karlsson<sup>5</sup> och Gunnar Bergström<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Statsveterinär, Enh f djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA, 751 89 Uppsala, och  
Professor, Inst f kliniska vetenskaper, SLU, Uppsala

<sup>2</sup>Docent, Universitetslektor, Sekt för Immunologi (V), SLU, BMC Box 588, 751 23 Uppsala

<sup>3</sup>VMD, Laborator, Enh f bakteriologi, SVA, 751 89 Uppsala

<sup>4</sup>PhD, Forskare, Enh f bakteriologi, SVA, 751 89 Uppsala

<sup>5</sup>Djurhälsoveterinär, Svenska Djurhälsovården, Malmen Hållsta, 635 18 Eskilstuna

<sup>6</sup>Chefveterinär, Svenska Djurhälsovården, 532 89 Skara

## Bakgrund

Denna rapport beskriver ett stort och långsiktigt projekt som belyser luftvägsinfektioner hos grisar. Forskargruppen är väletablerad och har god erfarenhet av att arbeta på det disciplinöverskridande sätt som krävts. De arbeten som beskrivs är praktiskt orienterade. De har kommit grisproduktionen tillgodo i form av rapporter och kurser till veterinärer, rådgivare och lantbrukare och de kommer att fortsätta att göra det.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (**APP**) är jämte *Mycoplasma hyopneumoniae* den betydelsefullaste luftvägspatogena mikroorganismen hos gris. Den drabbar främst grisar under slaktsvinsperioden. Vid perakuta fall kan grisarna dö timmar efter exponering till följd av endotoxinpåverkan. En subakut till kronisk form där grisarna överlever är dock mer vanlig. Även denna form orsakar lidande och försämrad tillväxt, dels till följd av **APP**-infektionen - men även till följd av sekundära infektioner. **APP** indelas i 13 officiella serotyper, vilka sinsemellan kan korsreagera (tabell 1).

Hittills har endast ett fåtal serotyper av **APP** påvisats i Sverige. Även här dominerar den subakuta formen, men enskilda besättningar kan drabbas svårt av den akuta formen. I Sverige har kliniska problem dominerats av serotyp 2, men även serotyp 3 och 6 har orsakat problem. Nyligen har även en serotyp 5 isolerats i Sverige. Denna stam, som har orsakat ett flertal dödsfall, är atypisk och skiljer sig i immunologiska tester från de officiella serotyperna 5a och 5b.

Tabell 1. Korsreaktioner mellan olika serotyper av **APP**. Tabellen visar även de serotyper som påvisats i Sverige, samt den diagnostiska beredskapen vad gäller serologi (indirekt ELISA) som finns i Sverige idag

<b>APP serotyp -&gt;</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5a,</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
Korsreagerar med	9, 11	-	6, 8	7	-	3, 8	4	3, 6	1, 11	-	1, 9	-
Påvisad i Sverige	-	ja	ja	ja	-	ja	-	-	-	-	-	-
Färdigställt Ag för ELISA	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Tillgång till kontrollserum	-	ja	ja	ja	-	ja	ja	-	ja	ja	-	-

## Redovisning till publicerade arbeten utförda inom projektet

Referenserna till publikationer inom projektet anges inom parentes med fet stil.

A motsvarar en akademisk avhandling.

Med början på V avses en vetenskapligt granskat artikel i internationell press,

Med början på K avses en rapport vid en internationell kongress

Med början på S avses en artikel av vetenskaplig kvalitet på svenska

## Material och metoder

Diagnostik av kliniska utbrott har initialt diagnostiserats med klassisk bakteriologisk odling där **APP** påvisats.

Inom ramen för projektet har agglutinationsserum utvecklats för att kunna definiera olika serotyper av **APP** med hjälp av typstammar som vänligen skänkts av Vibeke Sørensen, Veterinärinstitutet i Danmark, Köpenhamn (**S2, S4**). För att jämföra olika serotypers egenskaper över tid jämfördes grupperades **APP**-isolat från olika tidsperioder efter serotyp och jämfördes med hjälp av Pulsfältsgeloelektrofores (PFGE; **V4, K4**).

Typstammarna stammar har även använts för att framställa antiserum i gris. Dessa användes sedan som kontrollserum i de ELISA-metoder som utvecklades för att kunna detektera antikroppar riktade mot olika serotyper av **APP** som utvecklades inom projektet (**S2, S4**).

På samma sätt användes det svenska fältisolatet av den atypiska varianten av serotyp 5 för att framställa en diagnostik av denna stam, såväl vad gäller påvisande av själva bakterien som av antikroppar (**S3**).

ELISA-metodiken användes för att utskilja suggor med höga och låga nivåer av antikroppas riktade om **APP** i en kroniskt infekterad besättning (**V6, K1, K3**). Dessutom följdes avkommor till dessa suggor serologiskt ram till slakt och en metod att mäta antikroppar riktade mot *Pasteurella multocida* (**Pm**) med avsikt att påvisa eventuella sekundärinfektioner etablerades (**V6, K1**).

Effekten av ett kommersiellt vaccin (Porcilis APP, Intervet) i en besättning med kliniska problem med **APP**-infektioner följdes med antikroppsdetektion och genom att mäta behandlingsincidens, produktionsparametrar och sjukdomsregistreringar vid slakt (**V5, K6**).

Det primära immunsvaret vid **APP** infektioner studerades genom att infektera naiva grisar (serogrisen) med en högvirulent stam av **APP** serotyp 2 och det sekundära immunsvaret studerades genom att återinfektera dessa djur 28 dagar efter den första infektionen. I dessa arbeten studerades även hur immunsvaret påverkades av olika behandlingsstrategier med antibiotika i samband med primärinfektionen (**V3, V7, K5, K7**).

Med avsikt att studera hur sekundära infektioner kan relateras till infektioner med **APP** utvecklades en ELISA som mätte antikroppar ritade mot *Pasteurella multocida*. (**V6, K1**).

## Resultat i form av genomförda övergripande mål

- 1) Att ha etablerat diagnostiska metoder för samtliga typstammar av **APP**. Agglutinationsserum för att kunna serotypa bakterier och ELISA-teknik för att påvisa antikroppar (**S2**).
- 2) Att ha etablerat en kompetens för att kunna etablera diagnostiska metoder för atypiska stammar av **APP** har förvärvats. I praktiken är den också bevisad i samband med att den atypiska stammen av serotyp 5 påvisades i Sverige (**S2, S3**).
- 3) Att ha jämfört **APP**-stammar som isolerats vid olika tidpunkter och därigenom ha fastslagit att de stammar av serotyp 2 som cirkulerar idag är identiska med isolat från 1970-talet (**V4, K4**).
- 4) Att mönstret för hur akutfasproteinsvaret ser ut vid en primärinfektion med **APP** är kartlagt. Det är också fastslagit att detta mönster kan påverkas (lindras) av tidigt insatt effektiv behandling mot infektionen (**V3, V7, K5, K7**).
- 5) Att det sekundära immunsvaret, dvs vid en återinfektion med **APP**, och hur/om djuren utvecklar och bevarar en immunitet mot sjukdomen är dokumenterat (**V3, V7, K5, K7**).
- 6) Att den maternella immuniteten avseende **APP** har studerats (**V6, K3, S1**) och att vi har dokumenterat skillnader i denna mellan avkommor till sugor med höga och låga antikropps nivåer (dvs mellan avkomman till "high responders" och till "low responders").
- 7) Att infektionsdynamiken vad gäller **APP** är studerat i en problembesättning hos såväl diande grisar som hos slaktsvin (**V6, K1**) och i dessa studier har även tagits hänsyn till sekundärinfektioner, liksom djurens immunkapacitet (avkomma till "high" eller "low responder").
- 8) Att en klinisk prövning av en ny vaccinationsstrategi i en besättning med problem med **APP** är genomförd (**V5, K6**).
- 9) Att ha utvecklat en fungerande ELISA som mäter antikroppar ritade mot *Pasteurella multocida* med syfte att studera sekundära luftvägsinfektioner som följer i spåren på en infektion med **APP**. (**V6, K1**).
- 10) Att den doktorand som anställts inom projektet, veterinär Marie Sjölund, har disputerat med **APP**- infektioner hos gris som huvudtema (**A**).

## Diskussion

Inom ramen för projektet diagnostik för serotyp 1-12 av **APP** inklusive 5a och 5b konstruerats och kvalitetssäkrats (**S2**). Detta visade sig vara viktigt då serotyp 5 strax därefter för första gången diagnostiserades i landet (**S3**). Denna variant av bakterien visade sig vara atypisk och serologisk diagnostik baserad på typstammarna detekterade inte antikroppar mot denna stam. Genom att konstruera en ELISA baserad på fältisolatet av serotyp 5 lyckades vi påvisa antikroppar mot den aktuella stammen och sjukdomsutbrottet kunde dokumenteras (**S3**). Det föreföll senare som om denna variant av serotyp 5 trots att den var dödlig för grisare inte själv var överlevnadsduglig vid en nationell screening (**S4**) och så även i en senare nationell inventering utförd av Svenska Djurhälsovården.

Till vår förvåning upprepades dock detta scenario år 2007 då en atypisk variant av serotyp 5 ånyo påvisades. Inte heller denna gång detekterad de ELISA-system som grundade sig på typstammarna antikroppar mot mikrob. Däremot fungerade den ELISA som utvecklades från det första atypiska isolatet av serotyp 5 utmärkt även mot detta isolat och senare utförda pulsfältsgelelektroforesundersökningar har visat att stammarna från de olika tidsperioderna har ett identiskt mönster (**V4, K4**).

Detta betyder att antingen hade en närmast identisk mutation inträffat hos denna bakterie som förvisso är mycket förändringsbenägen (därför de många serotyperna), eller så försvann aldrig stammen helt och hållet efter de första incidenserna. En fortsatt övervakning av detta förefaller därför viktig.

Mönstret för akutfasproteiner i samband med en akut infektion med **APP** har utvärderats. Det förefaller som om Serum-amyloid A (SAA) skulle kunna ha en potential för att kunna användas som akutfasmarkör Interleukin 6 hade en för snabb och för kort duration för att kunna vara av praktisk nytta och haptoblinnivåerna i blodet steg endast marginellt innan det att antikroppar kunde påvisas (**V1, V7**). Den genomförda studien visade även att akutfasset kunde lindras vid snabbt insatt och effektiv behandling (**V1, V7, K7**). **APP**-infektioner visade sig även påverka tarmfloran negativt (**V2**), sannolikt genom den allmänpåverkan som infektionen medför. Detta kan i sin tur medföra långsiktiga negativa konsekvenser för drabbade djur i form av en försämrad återhämtning.

Inom projektet har även det sekundära immunsvaret studerats i samband med en reinfektion av djur som vid en första exponering behandlats med olika effektiva läkemedel (**V3, V7, K5, K7**). Det visade sig att djur som bildat antikroppar var immuna mot en reexponering av **APP**, men att djur som behandlats tidigt efter infektion och med så effektiva antibiotika att de inte serokonverterat inte var immuna (**V3, K5**) och vid den reinfektionen uteblev akutfas-svaret hos dessa djur helt (**V7, K7**).

De djur som till följd av snabbt insatt effektiv behandling inte bildade antikroppar om **APP** efter den första infektionen reagerade vid reinfektionen såsom om de varit oexponerade för **APP**, dvs de bildade akutfasproteiner, de blev sjuka och de bildade med tiden antikroppar mot **APP** (**V7, K7**). Därför vore ytterligare studier av intresse, där tidpunkten för insatt behandling i förhållande till infektionstidpunkt varieras, med syfte att fastställa hur lång exponering som immunförsvaret måste ha innan en effektiv behandling sätts in för att det ska utveckla en skyddande immunitet. Detta därför att man inom ramen för praktisk produktion kanske inte kan räkna med att sjuka djur behandlas så snabbt att ett antikroppssvar blockeras. Om så är fallet kanske den gjorda observation äger mindre klinisk relevans, Oavsett äger den däremot stor relevans vad gäller profylaktisk behandling av ännu inte insjuknade djur som senare kan komma att reexponeras för mikrob.

En annan reflektion från de experimentella infektionsförsöken var att var behandling med penicillin inte var effektivt trots att bakterien enligt resistensundersökningen var känslig för

penicillin (**V3, V7**). Orsaken till den uteblivna effekten är därmed troligen en farmakokinetisk fråga, dvs hur läkemedlet distribueras i kroppen och det kan därför röra sig om en doseringsfråga. I dessa studier följdes rekommendationen från FASSvet. Då penicillin är ett smalspektigt antibiotika och därmed ett bra förstahandsalternativ vore det därför intressant att undersöka om en högre dos av penicillin än den som anges i FASS är effektiv vid behandling mot APP-infektion

Den akuta formen av **APP** är en allvarlig sjukdom som ofta har en dödlig utgång och sjukdomen synes vara ökande i Sverige. Teorier om att nya varianter av de stammar av serotyp 2 som (förutom vid serotyp 5-utbrotten) så gott som alltid har diagnostiserats skulle ha utvecklats har därför framförts. Med hjälp av pulsältsgeloelektroforesundersökningar har vi dock visat att de stammar tillhörande serotyp 2 som isoleras idag är identiska med dem som isolerades på 1970-talet (**V4, K4**). Mycket talar således för att det istället är den ökande besättningsstorleken som givit nya förutsättningar för dessa mikrober och nya strategier att bemöta detta måste utvecklas.

En strategi att bekämpa **APP** kan vara att vaccinera djuren. Ett utökat vaccinationsprogram har evaluerats i en större slaktsvinsbesättning med problem med **APP** serotyp 2-infektioner, dessvärre med ett svårtolkat resultat (**V5, K6**). I undersökningen vaccinerades grisarna vid ankomst till besättningen samt fyra veckor senare i ett första skede. Senare under studien vaccinerades grisarna tre gånger med den första vaccinationen vid ankomst och de efterföljande två vaccinationerna med fyra veckors mellanrum. Tyvärr minskade inte förekomsten av elakartad lungsjuka hos de vaccinerade grisarna. Däremot sjönk antalet registrerade brösthinneinflammationer vid slakt markant med tiden. Studien visade att vaccinationerna inte skyddade grisarna mot sjukdom men att smittrycket minskade över tid. Huruvida detta var en effekt av vaccinationerna kunde inte säkert visas. Troligen kan en ökad uppmärksamhet bland personalen ha bidragit till att fler fall av akuta lunginflammationer upptäcktes med en ökad behandlingsfrekvens som följd. Sannolikt har den ökade frekvensen behandlingar bidragit till att minska smittrycket vilket visade sig i färre registrerade brösthinneinflammationer vid slakt. Även de förbättrade rutinerna för tvättning av avdelningarna mellan omgångarna bidrog troligen till det minskade smittrycket (**V5, K6**).

Sammantaget antyder resultaten att de vacciner som vinns kommersiellt tillgängliga idag inte ger lika gott skydd som vi vid de experimentella infektionerna visat att en exponering för bakterien gör (**V3, V7, K5, K7**). Framtida forskningsinsatser för vacciner fokusera på att bättre stimulera immunförsvaret med syfte att erhålla en skyddande immunitet mot **APP** hos djuren. Möjliga vägar kan vara att ändra beredningar av antigen i vacciner, att använda andra adjuvansmolekyler, eller att finna effektivare sätt att applicera vaccinerna. Även optimering av tidpunkt för vaccinering bör beaktas

Det maternella skygdet mot **APP** har studerats i en problembesättning Suggor utgör en heterogen grupp som svarar med olika höga nivåer av antikroppsproduktion trots att de vistas i samma miljö. Detta återspeglas även i den råmjölkförmedlade immuniteten hos smågrisarna, där avkomman till "high responders" erhåller ett betydligt bättre skydd än avkomman till "low responders" (**V6, K3, S1**). Detta kan ha en praktisk implikation då suggans egen immunitet sjunker i samband med grisning pga förflyttning av cirkulerande antikroppar från blodet till råmjölken (**V6, K3**). Möjligtvis kan effektiva vaccinationer stärka såväl suggans som smågrisens skydd.

Även strategiska behandlingar för att minimera risken för att "low responders" ska aktivera en endogen smitta kan övervägas i problembesättningar, inte minst eftersom avkomman till "low responders" i en sådan problembesättning visade sig insjukna med **APP** tidigare än avkomman till "high responders", för att därefter i sin tur smitta ner även dessa (**V6, K1, K3**). Därmed kan en infektionskaskad uppstå. I praktiken är det iverd sådana tillstånd inte alltid är lätt att särskilja **APP** från andra primär- och sekundärpatogena sjukdomar. För att studera detta förlopp har den ELISA som inom projektet konstruerats för att följa utvecklingen rörande sekundärinfektioner orsakade av *Pasteurella multocida* av stort värde. (**V6, K1**).

## Generell summering

Detta är ett fortsättningsprojekt där SLF bidragit till såväl del 1 som del 2. Projektet har framskridit planenligt, man har under en period försenats till följd av förändringar vid SLU. Uppskov har även begärts och erhållits för slutredovisning så att den doktorand som anställts inom projektet, Marie Sjölund, har kunnat slutföra sin avhandling före slutredovisningen.

Inom ramen för det här projektet har en akademisk avhandling och 7 vetenskapliga artiklar publicerats i internationella vetenskapliga tidskrifter. Därutöver har forskningsrönen presenterats i form av 7 internationella kongressrapporter vid International Pig Veterinary Society Congress under 2004-2010. Resultaten rörande pulsfältsgelelektotyper för att se genetiska skillnader mellan olika isolat av *APP* presenterades även i en egen rapport vid Pig Veterinary Society Congress i Edinburgh 2008 där Per Wallgren var speciellt inbjuden huvudtalare.

Nationellt har forskningsrönen förutom de sex publikationerna i fack- och lantbrukspress som anges nedan även använts flitigt vid såväl kurser som konferenser, vidareutbildningar och basutbildningar av veterinär- och agronomstudenter.

## Publikationer och övrig resultatförmedling inom projektet

### Vetenskaplig avhandling:

- 1) Marie Sjölund (2010) *Actinobacillosis pleuropneumoniae*. A major respiratory pathogen in pigs. Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU, Uppsala, Sverige. Doctoral Thesis No. 2010:73.

### V. Publikationer i vetenskapligt granskade tidskrifter

- 1) Hultén, C., E. Johansson, C. Fossum and P. Wallgren (2003) Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 95: 75-89.
- 2) Zoric, M., A. Arvidsson, L. Melin, I. Kuhn, J.E. Lindberg and P. Wallgren. (2003) The significance of an exposure to *Actinobacillus pleuropneumoniae* for the faecal coliform microflora and the digestibility of nutrient in specific pathogen free pigs. *J. Appl. Res. Vet. Med.* 2:293-302.
- 3) Sjölund, M., A.J. Martín de la Fuente, C. Fossum and P. Wallgren (2009) The effects of a challenge infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs treated with antibiotics at the primary infection. *Vet. Rec.* 164 (18): 550-555.
- 4) Wallgren, P and A. Aspán (2009). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. A comparison of Swedish isolates of serotype 2 and 5 over time. *Pig J*, 62; 88-89.
- 5) Sjölund, M. and P. Wallgren (2010) Field experience with two different vaccination strategies aiming to control infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a fattening pig herd. *Acta Vet Scand.* 52:23. 10pages
- 6) Sjölund, M., M. Zoric, M. Persson, G. Karlsson and P. Wallgren (2011) Disease patterns and immune responses in the offspring to sows with high or low antibody levels to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Res. Vet. Sci.* 91:25-31.
- 7) Sjölund, M., C. Fossum, A.J. Martín de la Fuente, M. Alava, H. Juul-Madsen, F. Lampreave and P. Wallgren (2011) Effects of various antimicrobial treatments on serum acute-phase responses and leukocyte counts in pigs after a primary and a secondary challenge infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Rec.* 10.1136/vrd2268

## K. Kongressrapporter:

- 1) Wallgren, P. M. Sjölund, M. Persson, M. Zoric and G. Karlsson (2004) Spread of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* in a pig herd chronically affected by respiratory disorders. Proc. IPVS 18: (1) 160.
- 2) Wallgren, P. (2004) Evidence of both virus and bacteria during an acute outbreak of respiratory disease in a fattening pig herd. Proc. IPVS 18: (1) 201.
- 3) Sjölund, M., M. Zoric, M. Persson and P. Wallgren (2004) Maternal protection to infections caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* - effects of the immune status of the dam. Proc. IPVS 18: (1) 409.
- 4) Aspán, A. and P. Wallgren (2008) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Comparisons of Swedish isolates of serotype 2 and 5 over time. Proc. IPVS 20 (oral): 121.
- 5) Sjölund, M., J. Martin de la Fuente and P. Wallgren (2008) Effects of a second challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs treated with different antibiotics at the primary infection. Proc. IPVS 20 (oral): 125.
- 6) Sjölund, M and P. Wallgren (2008) A three-fold vaccination strategy aiming to control actinobacillosis in a fattening herd. Proc. IPVS 20 (poster): 225.
- 7) Sjölund, M., C. Fossum and P. Wallgren. (2010) Acute-phase responses following repeated infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the presence and absence of medical treatment. Proc IPVS. 21:599

## S. Publikationer på svenska

- 1) Sjölund, M., M. Zoric, M. Persson and P. Wallgren (2002) Maternellt skydd mot infektioner med *Actinobacillus pleuropneumoniae* hos smågrisar – studier rörande effekter av saggans immunstatus. (Maternal immunity to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*) Jordbrukskonferensen, SLU, Uppsala, sid 222.
- 2) Wallgren, P., M. Persson and A. Gunnarsson (2003) *Actinobacillus pleuropneumoniae* hos gris. I. Diagnostikutveckling efter ett utbrott med serotyp 5. (*Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. I. Development of diagnostic tools following an outbreak with serotype 5) Svensk VetTidn. 55 (7) 9-13.
- 3) Wallgren, P., M. Sjölund, N. Holmgren, M Gerth-Löfstedt and G. Bergström (2003) *Actinobacillus pleuropneumoniae* hos gris. II. Klinik och spridning vid ett utbrott med serotyp 5. (*Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. II. Clinical manifestations and spread of an outbreak with serotype 5) Svensk VetTidn. 55 (7) 15-24.
- 4) Wallgren, P., M. Elvander and A. Engvall (2003) *Actinobacillus pleuropneumoniae* hos gris. III. Serologisk inventering av svenska serotyper. (Serological inventory of Swedish serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*) Svensk VetTidn. 55 (7) 25-28.
- 5) Wallgren, P., M. Sjölund and U. Grönlund-Andersson (2009) *Actinobacillus pleuropneumoniae* extra viktig att diagnostisera (*A. pleuropneumoniae* important to make laboratory diagnosis). Svensk VetTidn. 61 (5) 19-22.
- 6) Sjölund, M. (2011) Ny kunskap om immunförsvarets betydelse: Skyddet mot *A. pleuropneumoniae*-infektioner kan ökas. SVA-vet. 1, 13-16

Därutöver har materialet presenterats i samband med undervisning och kurser för lantbrukare, rådgivare, agronomer, veterinärer, veterinärstudenter och agronomstudenter.