

Slutrapport: Metodik för bedömning av risk för frasbrandsutbrott på besättningsnivå

Bakgrund

Frasbrand är en klostridieinfektion hos nötkreatur, orsakad av s.k. histotoxiska klostridier, främst *Clostridium chauvoei*. Även får kan drabbas av infektionen (Songer, 1998), men de utbrott som rapporterats i Sverige har endast omfattat nötkreatur. I vissa delar av landet är frasbrand ett allvarligt djurhälsoproblem som orsakar stora förluster för djurägaren, främst i köttdjursbesättningar. Större svenska utbrott har rapporterats 1983 (Wierup & Sandstedt, 1983), 1995 och 1998 (Sternberg *et al*, 1999) och enstaka fall rapporteras årligen, främst i Kalmar län (se tabell 1.). Enligt SJV:s föreskrifter om anmälningspliktiga djursjukdomar är det endast primärfallet av en sjukdom som skall rapporteras, siffrorna nedan representerar alltså inte totalantalet insjuknade djur.

Tabell 1. Rapporterade frasbrandsutbrott enligt SJV:s statistik (källa www.sjv.se)

År	Totalt antal rapporterade utbrott
1997	4
1998	13
1999	5
2000	14
2001	15
2002	26
2003	15
2004	6

Vid flera utbrott har uppmärksamats att alla fall inte diagnostiseras och rapporteras (Sternberg *et al*, 1999). Det är ytterst troligt att antalet frasbrandsfall i landet är många fler än det rapporterade antalet fall i landet, både på grund av underdiagnostisering och på grund av brister i rapporteringen, men också för att endast primärfallet rapporteras vid ett utbrott.

Sjukdomen uppstår genom att djuren infekteras peroralt med bakteriesporer från marken eller kontaminerat vallfoder. Sporererna sprids sedan till lever och muskulatur där de kan ligga vilande tills en muskelskada eller liknande ger en gynnsam tillväxtmiljö (Smith & Holdeman, 1968, Timoney *et al*, 1988, Gyles, 1993). Vid tillväxt av den vegetativa formen av bakterierna produceras toxiner som ger hemolys och nedbrytning av muskelvävnad. Metaboliter från skadad vävnad och bakterietoxiner som kommer ut i blodcirkulationen ger en toxinemi som snabbt leder till döden på grund av skador på hjärtmuskulatur och inre organ (Timoney *et al*, 1988, Gyles, 1993, Radostits *et al*, 1994). De kliniska symtomen ses först som håla, ofta på ett bakben. Muskulaturen i övre delen av det drabbade benet är varm, svullen och öm, för att senare bli svalare med förlust av smärtekänslighet och karaktäristiska frasande emfysem (därav namnet). Feber, matvägran och kraftigt nedsatt allmäntillstånd ingår också i sjukdomsbilden. Djuren dör vanligen inom ett dygn efter symtomdebut och många gånger ses inga symtom alls utan bara plötsliga dödsfall (Radostits *et al*, 1994, Helman *et al*, 1997). Ibland talar man då om visceral frasbrand, då hjärtmuskulatur och inre organ främst är drabbade och inte skelettmuskulatur (Radostits *et al*, 1994). Vid obduktion ses mörkt missfärgade områden i muskulaturen, ofta med gasbildning och vätskeutträde. Kadavret luktar härsket och förruttnelsen går snabbt. Mjälten är blodfylld, lever och njurar sönderfallande och på slemhinnor ses ofta blödningar. Vid visceral frasbrand ses inga förändringar i skelettmuskulaturen, utan vanligen bara perikardit, eventuellt tillsammans med skador i hjärtmuskulatur och inre organ (Helman *et al*, 1997, Radostits *et al*, 1994). Dock kan skelettmuskelskadorna vara så små och ligga så djupt i muskulaturen att de lätt förbises.

Frasbrand drabbar främst unga snabbväxande djur på bete (Smith & Holdeman, 1968), men under senare år har man bl.a. i Kalmar län uppmärksammat att sjukdomen uppträtt även under stallperioden, något som observerats även i andra länder (Jackson *et al*, 1995).

Länsveterinärerna i Kalmar anordnade därför under våren 2001 ett möte med länets stordjurspraktiserande veterinärer och laboratorieveterinärer samt en representant från SVA för att diskutera profylax och hantering av misstänkta utbrott. Under dessa diskussioner framkom att det är av stor vikt att veta hur stor sjukdomsrisk är i olika områden vid olika tidpunkter på året, för att kunna välja strategi (vaccination eller ej, vilka djur som ska vaccineras, sambete etc).

I utländska studier har man funnit att bakteriesporerna är vanligt förekommande i gödsel och jord (Gyles, 1993, Timoney *et al*, 1988, Hang'ombe *et al*, 2000). Smittrycket kan därmed bli mycket högt på vissa betesmarker och det förefaller logiskt att ju högre smittrycket är desto större är risken för att betsdjur skall insjukna. Eftersom klostridiesporer är mycket motståndskraftiga mot fysikalisk påverkan kan de också finnas kvar i ensilage skördat från smittade marker (Thylin, 2000). Klostridiesporer överlever pastöriseringssteget i biogasanläggningar (Sahlström *et al*, 2002) och detta kanske i förlängningen kan bidra till att *C. chauvoei* sprids från smittade djur via rötrest till tidigare osmittad åkermark.

Betesdjur kan skyddas med hjälp av vaccin. Det finns f.n. i Sverige inget vaccin registrerat för användning på nötkreatur men vid SVA finns sedan november 1998 en licens för vaccinet Miloxan (Merial) avsett för vaccination av nötkreatur mot frasbrand. När det gäller vallfoder kan åtgärder såsom högre stubb vid ensilageskörd, tillsats av extra syra vid ensilering eller produktion av hö istället för ensilage från smittade betesmarker minska risken för att viabla klostridiesporer finns kvar i fodret (Thylin, 2000). Dessa preventiva åtgärder medför dock många gånger stora kostnader för djurägaren. För att bedöma behovet av olika åtgärder och vilka som bäst skyddar djuren i en aktuell besättning behöver man kunna kvantifiera förekomsten av *C. chauvoei*-sporer på betesmarker och i vallfoder, samt veta hur denna kan korreleras till risken för utbrott av frasbrand i besättningen. Då vallfoder såsom ensilage och hö är komplicerade material att undersöka och foderprov på besättningsnivå alltid är osäkert som "facit" (då det foder som orsakat sjukligheten vanligen redan konsumerats av djuren) kan det vara enklare och säkrare att vid utbrott under stallperioden undersöka träck från djuren i besättningen. Förekomst av *C. chauvoei* i träck indikerar att fodret djuren ätit innehållit sporer.

Isolering och identifiering av *C. chauvoei* från kliniska prover, där bakteriehalten är hög, görs relativt lätt, förutsatt att proverna tas ut och transporteras korrekt och att optimal odlingsteknik används. Däremot finns idag ingen standardiserad metod för identifiering och kvantifiering av *C. chauvoei*-sporer i provmaterial från jord, träck och vallfoder. Utveckling av en sådan metod skulle möjliggöra vidare epidemiologiska studier. Jämförelser mellan förekomst av *C. chauvoei*-sporer i besättningar som haft utbrott och besättningar som inte haft utbrott, inom "riskområden" (dvs områden där frasbrand är vanligt) resp. övriga områden (där frasbrand ej rapporterats), bör ge den information som behövs för att bedöma risken baserat på provtagning av vall och foder. Eftersom bakterierna kan vara mycket svåra att upptäcka i odling från provmaterial med riklig förekomst av andra bakteriearter torde identifiering med hjälp av PCR-teknik vara att föredra i detta fall. Användbara PCR-system finns beskrivna (Kojima *et al.*, 2000, Kojima *et al.*, 2001, Sasaki *et al.*, 2000, Sasaki *et al.*, 2001) Syftet med detta projekt har varit att utveckla en identifieringsmetod för *C. chauvoei* som är användbar på provmaterial från betesmarker (jord) och träck, samt att utvärdera metoden som bas för riskbedömning avseende frasbrandsutbrott i enskilda besättningar.

Material o Metoder

Rening av DNA från provmaterial

Den säkraste metoden att rena DNA från "smutsiga" provmaterial som t. ex. jord, gödsel eller ensilage är preparering med fenol och kloroform. Dessa ämnen medför dock arbetsmiljörisker, varför andra metoder provats. Ett kit (Ultraclean Soil DNA kit från Immuno Diagnostic OY), framtaget för att rena DNA från jordprover, Percoll (små kulor som separerar bakterie-DNA från övrigt material), tillsats av PVPP (binder organiska fettsyror som kan störa PCR-analysen) till träckprover och Chelex (binder metalljoner som kan störa PCR-analysen) till jordprover, samt s.k. koklysat från primärodlingsskott har testats. Både direkt preparering från provmaterial och olika anrikningsmetoder provades.

För fältproverna (se nedan) användes koklysat enligt en modifierad metod av Hang'ombe *et al.* (2000). Proverna slammades upp i vatten som sedan fick sedimentera. En del av supernatanten överfördes till provrör och för att minska kontaminationsfloran upphettades provrören med supernatanten till 65° C. Därefter odlades proverna ut på anaeroba plattor och från plattorna gjordes koklysat som sedan analyserades med PCR.

PCR

Två olika specifika primers testades, den ena riktad mot flagellinogenen (Kojima *et al.* 2001) och den andra mot en specifik sekvens i 16S-23S rDNA spacer regionen (Sasaki *et al.* 2000). Den senare användes för analys av material från kliniska prover, för detektion av *C. chauveoi* i spikade prover med träck och jord, samt för fältprover bestående av träck och jord från besättningar på Öland (se nedan).

Fältprover

Prov från djur (träckprov) samt jord insamlades från 10 besättningar på Öland. Alla besättningarna hade haft konstaterade fall av frasbrand de senaste åren. Antal prov redovisas i tabell 1.

Enkät drabbade besättningar

I samband med insamlandet av fältprover frågades djurägarna ut om eventuella riskfaktorer, enligt en framtagen enkät. Frågorna rörde besättningsstorlek, fall av frasbrand, vaccination mot frasbrand, typ av bete, betesperiod, utfodring, strömedel och gödselhantering.

Planerad epidemiologisk studie

Då PCR-metodikens detektionsnivå vid test på provmaterial från frasbrandsdrabbade besättningar visat sig vara för hög för att metodiken skall vara användbar i fält (se resultat) har den planerade epidemiologiska studien med jämförelser mellan besättningar med fall av frasbrand och "frasbrandsfria" besättningar ej varit meningsfull att genomföra.

Resultat

Kliniska prover för frasbrandsdiagnostik utgörs av blod, muskulatur eller annan vävnad, där bakterien förekommer i nästan renkultur. Identifiering av *C. chauveoi* från dessa provmaterial fungerar bra med PCR.

Extraktion medelst koklysat är enklast och har visat sig fungera bäst för både jord- och gödselprover. Med denna metod kunde en koncentration av 200 CFU/g av *C. chauveoi* påvisas i gödsel- och jordprover.

Inga *C. chauveoi* kunde påvisas i något av proven från frasbrandsdrabbade besättningar på Öland.

Information angående besättningsstorlek, frasbrandsvaccination och frasbrandsfall finns inkluderad i tabell 1. Vidare bearbetning av data från enkäten pågår. Den större epidemiologiska studien genomfördes ej, varför resterande medel till projektet återbetalas.

Tabell 1. Provantal m.m. i besättningar på Öland med konstaterad frasbrand

Besättning	Djurantal	Träckprov	Jordprov	Vaccinerar	Senaste fall
1	280	10	3	Ja	2002
2	210	10	3	Ja	2002
3	(sambete m 1)	0	11	-	-
4	130	10	3	Ja	2001
5	54	10	10	Ja	2001
6	250	10	5	Ja	2003
7	120	7	8	Ja	2001
8	170	10	10	Ja	2002
9	95	10	6	Nej	2004
10	390	10	10	Nej	2004

Diskussion

Projektet har visat att PCR-metodik kan användas för diagnostik av frasbrand avseende material från kliniska fall. Detta innebär en snabbare och säkrare diagnostik av kliniska fall, då odling och typning är mer tidskrävande och medför risk att bakterierna dör under provtransport, eller att det blir överväxt från föroreningsflora och därmed svårigheter att påvisa *C. chauveoi*. *C. chauveoi* växer långsamt och PCR kan verifiera positiva fall fortare än traditionella typningsmetoder.

Detektionsnivån för PCR på prover från träck och jord kan betraktas som för hög för att en kvarvarande smitta i besättningen skall kunna påvisas. Detta bekräftas av resultaten från analys av proverna från Öland. Vanlig PCR-metodik är alltså inte användbar för bedömning av frasbrandsrisken i enskilda besättningar.

Enkätundersökningen stöder teorin att vaccination förebygger utbrott, då alla besättningar som vaccinerar djuren inte haft utbrott senare år. Inga skillnader förelåg i möjligheten att detektera *C. chauveoi* i prover från besättningar som nyligen haft utbrott och som ej vaccinerade, jämfört med besättningar som vaccinerade. Materialet är dock för litet för säkra slutsatser i detta avseende. Dock skulle man kunna förvänta sig kvarvarande smitta även i besättningar som vaccinerar, varför problemet troligen ligger i den höga detektionsnivån för analysmetoden och inte i besättningsurvalet.

Vidare analys av enkätsvaren pågår, men då undersökningen är mycket begränsad kan inga slutsatser avseende riskfaktorer förväntas. Den planerade större epidemiologiska studien genomfördes ej, då detta inte sågs som meningsfullt när PCR-metodiken inte kunde detektera *C. chauveoi* i något prov från de 10 undersökta Ölandsbesättningarna som alla haft ett flertal fall av frasbrand.

Vidare försök med s.k. realtids-PCR kommer att företas vid SVA, för att om möjligt sänka detektionsnivån för PCR-analysen. Sparat provmaterial från detta projekt kommer att användas även för dessa undersökningar.

Litteraturförteckning

- Gyles, C.L., 1993. Histotoxic Clostridia. In: Gyles, C.L. & Thoen, C.O. (eds): Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2nd ed. Iowa State University Press. Pp.106-113
- Hang'ombe, B.M., E. Isogai, J. Lungu, C. Mubita, A. Nambota, R. Kirisawa, K. Kimura & H. Isogai, 2000. Detection and characterization of Clostridium species in soil of Zambia. Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis. 23: 277-284
- Helman, G., R.D. Welsh, E.L. Stair & R.W. Ely, 1997. Diagnosing visceral blackleg as a cause of sudden death in cattle. Vet. Med. 92: 914-918
- Jackson, C.A., W.C. Rebhun & P.L. McDonough, 1995. Blackleg: a new perspective on an old disease. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 17: 1299-1303
- Kojima, A., I. Uchida, T. Sekizaki, Y. Sasaki, Y. Ogikubo, M. Kijima & Y. Tamura, 2000. Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei*. Vet. Microbiol. 76: 359-372
- Kojima, A., I. Uchida, T. Sekizaki, Y. Sasaki, Y. Ogikubo & Y. Tamura, 2001. Rapid detection and identification of Clostridium chauvoei by PCR based on the flagellin gene sequence. Vet. Microbiol. 78: 363-371
- Radostits, O.M., D.C. Blood & C.C. Gay, 1994. Veterinary Medicine – a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses, 8th ed. Ballière Tindall.
- Sahlström, L., E. Bagge & A. Albihn, 2002. The effect of pasteurisation in biogas plants: a laboratory study. In the proceedings of: Recycling of Agricultural, Municipal and Industrial Residues in Agriculture, 10th International Conference of the Network, Strbske Pleso, Slovak Republic
- Sasaki, Y., K. Yamamoto, A. Kojima, Y. Tetsuka, M. Norimatsu & Y. Tamura, 2000. Rapid and direct detection of *Clostridium chauvoei* by PCR of the 16S-23S rDNA spacer region and partial 23S rDNA sequences. J. Vet. Med. Sci. 62:1275-1281
- Sasaki, Y., K. Yamamoto, K. Amimoto, A. Kojima, Y. Ogikubo, M. Norimatsu, H. Ogata & Y. Tamura, 2001. Amplification of the 16S-23S rDNA spacer region for rapid detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. Res. Vet. Sci. 71:227-229
- Smith, L.D. & L.V. Holdeman, 1968. *Clostridium chauvoei*. The pathogenic anaerobic bacteria. American lecture series pp. 368-373
- Songer, J.G., 1998. Clostridial diseases of small ruminants. Vet. Res. 29: 219-232
- Sternberg, S., L. Sjöland, B. Bengtsson & S. Viring, 1999. Fräsbrandsutbrott bland nötkreatur i nordöstra Skåne 1998. Sv. Vet. Tidn. 51:117-121
- Thylin, I., 2000. Methods of preventing growth of *Clostridium tyrobutyricum* and yeasts in silage. Avhandling, SLU, Uppsala, Agraria 223. ISBN 91-576-5756-4
- Timoney, J.F., J.H. Gillespie, F.W. Scott & J.E. Barlough (eds), 1988. The genus Clostridium. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals, 8th ed. Cornell University Press, pp. 214-240
- Wierup, M. & K. Sandstedt, 1983. Fräsbrand och pulpy kidney disease – två aktuella klostridioser i Sverige. Sv. Vet. Tidn. 35: 23-24