

Spädgrisdödlighet orsakad av *Clostridium perfringens* typ A – uppföljande studier

Bakgrund

Under 2003 redovisades till SLF projektet ”Spädgrisdödlighet orsakad av *Clostridium perfringens* typ A (Dnr SLF 179/01, Projnr 0152008).

Sammanfattning av tidigare resultat

I 12 slumpvis utvalda medelstora smågrisproducerande besättningar obducerades 820 spädgrisar som dog under första levnadsveckan. Genomsnittligt uppvisade inom besättningar cirka en tredjedel 34 (12-54) % av grisarna akut tunntarmsinflammation som enda makroskopiska fynd. Näst vanligaste fyndet var klämskador 28 (16-52) %, därefter svält 17 (0-29) %.

Hos grisar med akut tunntarmsinflammation påvisades mikroskopiskt degenerativa förändringar i tunntarmens slemhinna. Samma typ av förändringar kunde ses hos grisar vilka dött av klämskador. De degenerativa förändringarna i tunntarmen var relaterade till en ökad förekomst av *Clostridium perfringens* typ A. Isolerade stammar av denna bakterie var bärare av genen för produktion av β_2 toxin men saknade genen för produktion av enterotoxin. De få (4 st) β_2 negativa *C. perfringens* typ A stammar som isolerades var samtliga från grisar med normal tunntarmsslemhinna. Hos spädgrisar i besättningar med diarreproblem påvisades sporer av *C. perfringens* i tunntarmen.

Ett flertal riskfaktorer identifierades för akut tunntarmsinflammation och klämskador. Sådana riskfaktorer var; äldre suggor, stora kullar, kullutjämning och när i grisningsperioden som grisarna föddes.

Av resultaten hittills framgår att akut tunntarmsinflammation var vanligt förekommande obduktionsfynd och att diarreproblem förekom hos späda grisar i vissa besättningar. CpA kunde knytas till dessa fynd. Dessa iakttagelser är inte nya utan finns beskrivna tidigare (7,8). Vegetativa stammar av *C. perfringens* typ A kan hos spädgrisar ge upphov till akuta dödsfall utan att diarre ses. Förändringarna i tarmarna liknar de som ses vid tarmbrand orsakad av *Clostridium perfringens* typ C, men de är lindrigare (8).

Sporbildande stammar av *C. perfringens* typ A kan ge upphov till diarre vilken uppträder i hög frekvens i vissa besättningar. Denna diarre orsakar ingen hög dödlighet men medför att grisarna blir eftersatta (2,4).

Det som är nytt i resultaten hittills är den stora andelen fall med akut tunntarmsinflammation bland döda grisar samt att degenerativa tarmförändringar även kunde påvisas mikroskopiskt hos ihjällegade grisar. Detta indikerar att dödligheten före avvänjning skulle kunna reduceras avsevärt om effekterna av *C. perfringens* typ A på spädgrisarna kunde kontrolleras.

Dödligheten före avvänjning, som idag är i genomsnitt 13-14% (PigWin Sugg), borde kunna sänkas till under 10 %.

I besättningar där *C. perfringens* typ A orsakar diarre hos spädgrisar behandlas grisarna med penicillin oralt. Eftersom vanligen mer än 70 % av kullarna drabbas i de flesta omgångar medför detta ett omfattande icke önskvärt bruk av antibiotika. Dessutom medför detta ett stort

merarbete för drabbade besättningar. Detta är ytterligare motiv för att söka profylaktiska åtgärder mot CpA i smågrisproducerande besättningar.

Målsättningen med de uppföljande studierna var att;

1. Studera tarmmorfologi samt förekomst av och egenskaper hos *C. perfringens* typ A hos spädgrisar vilka ej dött spontant.
2. Undersöka förekomsten av och egenskaperna hos *C. perfringens* typ A isolerade från spädgrisar i olika produktionssystem.
3. Undersöka om smittspredning sker mellan moderdjur och smågrisar.
4. Försöka förhindra diarre orsakad av *C. perfringens* typ A hos spädgrisar genom högttryckstvätt och desinfektion i enhetsboxar

1. Undersökning av *C. perfringens* från tarm hos kliniskt friska spädgrisar

Bakgrund

Samtliga grisar som obducerades hade dött spontant. Bakteriologiska och mikroskopiska undersökningar av tunntarmar utfördes hos de grisar som makroskopiskt uppvisade akut tunntarmsinflammation. Som kontrollgrisar valdes sådana som hade dött av traumatiska krosskador.

Mikroskopiska undersökningar visade att även ihjällegade grisar hade degenerativa förändringar i tunntarmens slemhinna. Detta antyder att det i första hand är sjuka och allmänpåverkade grisar som är disponerade för ihjälligging.

Med anledning av ovanstående önskade vi komplettera undersökningarna genom att studera tunntarmar hos grisar i samma ålder vilka ej dött spontant.

Material och metoder:

Från 1 (600 SIP) av de 12 besättningar som ingick i obduktionsförsöket (projnr 0152008) inhämtades kliniskt friska grisar. Från besättningen togs 4 grisar från vardera 3 olika kullar efter suggor. Dessa kullar eller deras suggor hade inte antibiotikabehandlats. Grisarna avlivades på deras 1:a-3:e levnadsdygn och obducerades 0,5, 6, 12, samt 18 tim efter det att de avlivats. I avvaktan på obduktion förvarades grisarna vid 20°C i obduktionssalen. vid AnalyCen, Skara. En gris från vardera av de 3 kullarna undersöktes vid varje tidpunkt efter avlivning. Vävnadsprover togs från tunntarmen för mikroskopisk undersökning (SVA, avd. för patologi, Uppsala). Från tunntarmen togs prover för aerob (*E. coli*) och anaerob (*C. perfringens*) bakteriologisk odling. Förekomst av sporulerade *C. perfringens* stammar undersöktes genom upphettning av tunntarmsinnehåll (80°C i 10 min) och efterföljande anaerob odling. Generna för toxinproduktion hos 3 st *C. perfringens* isolat per individ undersöktes med polymerase chain reaction (PCR)-teknik (SVA, avdelning för bakteriologi, Uppsala). Typning (typ A-E) utfördes med en multiplex PCR som baseras på förekomst av generna för de så kallade "major toxins" hos *C. perfringens*. Även förekomst av genen för enterotoxin och genen för β_2 toxin undersöktes med PCR (3).

Resultat och diskussion

Tiden som förflöt mellan avlivning och obduktion (0,5 – 18 tim) inverkade inte på de mikroskopiska fynden i tunntarmens slemhinna. Inte heller påverkades de bakteriologiska fynden i tunntarmsinnehållet (Tabell 1).

Sugga / kull inverkade på förekomsten av mikroskopiska fynd. Sålunda var totala graden av mikroskopiska fynd signifikant ($p < 0,05$) högre bland grisar från sugga A jämfört med bland grisar från suggor B och C. Totalt visade 6 av 12 smågrisar måttlig eller kraftig degeneration av tunntarmens slemhinna (Tabell 1). De olika graderna av slemhinneförändringar visas i Fig 1.

Ett typiskt fynd var stora vacuoler i uppsvällda epitelceller i tunntarmsvilli. Vidare mikroskopiska undersökningar med antikroppar riktade mot immunoglobulin G visade att detta immunoglobulin var spritt på ett oregelbundet sätt i slemhinnan och var inte lokaliserat till de stora vacuolerna i de uppsvällda epitelcellerna. Med hjälp av s.k. Pearl färgning kunde obundet järn påvisas i kraftigt uppsvällda epitelcellers vacuoler. Dessa mikroskopiskt – kemiska analyser antyder att vacuolerna i de uppsvällda epitelcellerna inte var involverade i upptaget av immunoglobuliner hos de späda grisarna, utan var istället troligen ett resultat av toxineffekter.

I tunntarmen påvisades en måttlig eller riklig växt av *C. perfringens* typ A. Alla isolaten bar genen för β_2 toxin produktion men saknade genen för enterotoxinproduktion. Avsaknaden av förmåga att bilda enterotoxin kan förklara varför inga av grisarna hade kliniska tecken på vattnig diarre.

Sammanfattning

Resultaten tyder på att *C. perfringens* typ A, som ej bildar enterotoxin men väl β_2 toxin, kan förekomma i riklig mängd i tunntarmen hos spädgrisar utan att diarre symtom ses.

Hos samma grisar var degenerativa förändringar vanligt förekommande i tunntarmens slemhinna. Intressant är att måttligt till kraftigt degenerativa förändringar sågs redan hos ett dygn gamla spädgrisar.

Tabell 1. Mikroskopiska och bakteriologiska fynd hos 12 st, 1-3 dygn gamla grisar, utan diarre symtom, olika tidpunkter efter avlivning

Su nr	Kull nr	L.född	Utg.	Döda	Kull	Åld.(d)	Mikroskopiska / bakteriologiska fynd efter avlivning (tim)			
							0,5	6	12	18
A	5	17	-2	4	11	1	III ^a	III ^a	III ^a	IV ^a
B	3	14	/	2	12	3	I ^a	I ^a	III ^a	I ^a
C	3	14	/	1	13	3	II ^a	I ^a	III ^a	I ^b

Mikroskopiska fynd, kategorier:

I Normal slemhinna

II Ytlig degeneration i villi, vacuolbildning i epitelceller, ökad genomblödning i villi

III Akut degeneration med förkortade och breddade villi, vacuolbildning och vävnadsdöd.

IV Akut inflammation med vacuolbildning och vävnadsdöd, hela ytliga slemhinnan i degeneration

Bakteriologiska fynd

- a: Aerob blandflora samt anaerobt måttligt eller rikligt med *Cl. perfringens* i blandflora.
- b: Rikligt med *E. coli* i sparsam bl. fl. samt sparsamt *Cl. perfringens* i blandflora.

2 och 3. Undersökning av *C. perfringens* från faeces hos kliniskt friska spädgrisar och suggor i olika produktionssystem

Bakgrund

De *C. perfringens* stammar som isolerades från obducerade grisar typades alla till typ A. Merparten av de isolerade *C. perfringens* typ A stammarna hade genen för produktion av ett nyligen upptäckt β_2 toxin (5). De få (4 st) β_2 negativa *C. perfringens* typ A stammar som isolerades var samtliga från grisar med normal tunntarmsslemhinna. Hos grisar med akut tunntarmsinflammation hade samtliga isolerade *C. perfringens* typ A stammar genen för β_2 toxin. Detta är i överensstämmelse med andra studier i vilka misstänks att β_2 toxin är en sjukdomsframkallande faktor (1,6). Dessa studier samt vår studie har emellertid en svaghet i att väldigt få *C. perfringens* typ A isolat undersökts från grisar utan kliniska symtom. Med bakgrund av detta är det av stor vikt att undersöka grisar utan kliniska symtom. Det framgår inte heller i andra studier om *C. perfringens* typ A isolerats från grisar i intensiva system eller från grisar i mer extensiv djurhållning. De grisar som vi hittills undersökt har kommit från besättningar med intensiva produktionssystem med strikt ålderssegregerad uppfödning. Från denna typ av besättningar rapporteras till Svenska Djurhälsovården ibland diarresymtom hos 70-80 % av kullarna. Stammar av *C. perfringens* typ A påvisas vanligen och grisarna behandlas individuellt med penicillin. Det är möjligt att den ålderssegregerade uppfödningen skapar miljöer i vilka sjukdomsframkallande *C. perfringens* typ A selektivt överlever. Det är därför motiverat att undersöka förekomsten av *C. perfringens* typ A och dess egenskaper hos grisar i olika produktionssystem.

Material och metoder

I 3 besättningar (86, 300 och 600 SIP) med intensiva system med ålderssegregerad uppfödning valdes 8 suggor ut per besättning. Varken suggor eller deras smågrisar hade behandlats med antibiotika. I dessa suggors kullar togs faecesprov från 3 grisar per kull, 2-3 dagar efter grisning. Jämförelsevis togs likadana faecesprover från spädgrisar i 3 besättningar (7, 15 och 100 SIP) med utegrisproduktion. Faecesprover togs med tops med Amies transportmedium. Faecesproverna odlades aerobt och anaerobt och bakterieväxten uppskattades semi-kvantitativt som sparsam, måttlig eller riklig. Isolerade *C. perfringens* stammar undersöktes avseende toxinproduktion med PCR enligt tidigare beskrivning.

Resultat och diskussion

C. perfringens typ A isolerades oftare i smågrisars faeces jämfört med i deras suggors faeces. I flera faecesprover från suggor förelåg endast enstaka *C. perfringens* kolonier. Detta gällde både i utegrisproduktion och i konventionell produktion (Tabell 2).

En semi-kvantitativ skattning av mängderna *C. perfringens* i faeces visade att suggor i utomhus produktion hade större mängder jämfört med suggor i konventionell produktion ($p < 0,05$). Mängderna *C. perfringens* i faeces från utomhus suggor och spädgrisar skiljde sig ej. Däremot förekom *C. perfringens* i betydligt större kvantiteter i konventionella spädgrisars faeces jämfört med i deras suggors faeces ($p < 0,001$) (Tabell 3).

Förutom att *C. perfringens* var vanligare och förekom i större kvantiteter så förekom dessutom *C. perfringens* sporer oftare i spädgrisars faeces jämfört med i deras suggors faeces. (Tabell 2).

Genen för β_2 toxin produktion påvisades betydligt oftare hos stammar av *C. perfringens* typ A isolerade från spädgrisars faeces jämfört med från deras suggors faeces. Allra mest vanlig var genen för β_2 toxin produktion bland *C. perfringens* Typ A isolat från konventionellt uppfödda spädgrisar (Tabell 2).

Samtliga isolat i undersökningen saknade genen för produktion av enterotoxin

Sammanfattning

C. perfringens typ A verkar på ett regelbundet sätt och i stor omfattning kunna etablera sig tidigt hos spädgrisar. Utmärkande för *C. perfringens* typ A hos speciellt konventionellt uppfödda grisar är att bakterien regelmässigt saknar förmåga att bilda enterotoxin men har förmåga att bilda β_2 toxin.

Förutsättningarna för detta verkar vara sämre hos deras suggor. Eftersom *C. perfringens* förekommer i liten omfattning och de isolerade stammarna i huvudsak avviker från spädgrisarnas beträffande förmåga att bilda β_2 toxin kan man ifrågasätta om spädgrisarna primärt smittas av sina suggor. Därmed har frågeställning nr 3 belysts. Då *C. perfringens* sporer regelmässigt påvisas i spädgrisarnas faeces är det möjligt att en kvarvarande boxsmitta med sporer förmår att åstadkomma infektionsövergrepp mellan grisningsomgångar.

Tabell 2

Frekvenser utomhus och konventionella suggor och deras 2-3 d gamla spädgrisar positiva i faeces för *C. perfringens* type A and *E. coli*. Jämförelser mellan kategorier grisar och uppfödningssystem

Kategorier	Bes.	<i>E. coli</i>	<i>C. perfringens</i>	Sporer	Beta 2 toxin
<u>Utomhus</u>	2	3/3	0/3	0	0
suggor	3	3/4	1/4	1/1	0/1
	6	4/8	7/8	7/7	0/7
S:a		10/15 (67%) ^a	8/15 (53%) ^a	8/8 (100%) ^{ab}	0/8 (0%) ^a
<u>Konventionella</u>	1	5/8	6/8	6/6	2/6
suggor	5	4/8	5/8	2/5	0/5
	7	1/8	3/8	3/3	3/3
S:a		10/24 (42%) ^a	14/24 (58%) ^a	11/14 (79%) ^a	5/14 (36%) ^a
<u>Utomhus</u>	2	4/9	8/9	7/8	5/8
spädgrisar	3	6/12	11/12	10/11	9/10
	6	14/24	24/24	24/24	23/24
S:a		24/45 (53%) ^a	43/45 (96%) ^b	41/43 (95%) ^{ab}	37/42 (88%) ^b
<u>Konventionella</u>	1	9/24	24/24	21/21 α	24/24
spädgrisar	5	24/24	24/24	24/24	24/24
	7	3/24	24/24	24/24	24/24
S:a		36/72 (50%) ^a	72/72 (100%) ^b	69/69 (100%) ^b	72/72(100%) ^c

Frekvenser inom kolumner med olika bokstäver skiljer sig signifikant, $p < 0.001$

α ; 3 prover ej testade.

Tabell 3

Semi-kvantitativ uppskattning of *C. perfringens* i faeces hos utomhus och konventionella suggor samt deras 2-3 d gamla spädgrisar. Antal prover i vilka *C. perfringens* påvisats

Kategorier	Växt av <i>C. perfringens</i>			S:a
	Sparsam	Måttlig	Riklig	
Utomhus suggor	2	3	3	8
Konventionella suggor	10	4	0	14
Utomhus spädgrisar	5	13	25	43
Konventionella spädgrisar	7	11	54	72
S:a	24	31	82	137

4. Försök att förhindra diarre orsakad av *C. perfringens* typ A hos spädgrisar genom högtryckstvätt och desinfektion i enhetsboxar

Bakgrund

I besättningar i vilka påvisats en hög andel grisar med *C. perfringens* sporer i tunntarmen hos spädgrisar har samtidigt 70-80% av kullarna uppvisat diarre under de första levnadsdygnen. Detta är i överensstämmelse med uppgifter i litteraturen (8).

Iakttagelser från en annan sådan besättning har visat att systematisk rengöring med högtryckstvätt och desinfektion med medlet Virkon®-S eliminerat diarreproblemen.

Målsättningen med nedanstående försök var att försöka dokumentera effekten av en sådan rengörings- och desinfektionsåtgärd på förekomsten av *C. perfringens* och förekomsten av diarre.

Material och metoder

Försöket utfördes i en smågrisproducerande besättning med 500 SIP. Grisning äger rum var 3:e vecka med 63 suggor per grupp. Under de 4 första levnadsdygnen drabbas 80-90 % av kullarna av spädgrisdiaarre. *E. coli* har ej kunnat knytas till diarren. Grisarna behandlas med penicillin oralt. Mer än 50% av undersökta spädgrisar har visats bära sporer av *C. perfringens*.

En försöksavdelning och en likadan kontrollavdelning med enhetsboxar utsågs. Inför omgångsbyte högtryckstvättades och desinficades försöksavdelningen med 4 % Virkon®-S. Separata överdragskläder och skodon används i försöksavdelningen. Kontrollavdelningen gjordes ren genom enbart högtryckstvätt.

Under första levnadsveckan registrerades dagligen kliniskt grisar med diarre. Under 1:a eller 2:a levnadsdagen togs faecesprov från 1 gris per kull från grisar med eller utan diarre. Proverna togs innan antibiotikabehandling utförs. Faecesproverna odlades aerobt och anaerobt. Isolat av *C. perfringens* karaktäriserades med PCR teknik och sporulerade stammar påvisades med upphettningstest (80°C i 10 min).

Förekomsten av grisar / kullar med diarre samt stammar av *C. perfringens* i faeces i försöksavdelningen jämfördes med förekomsten i kontrollavdelningen.

Resultat

En tendens till lägre andel spädgrisar med diarre konstaterades i den avdelning som behandlats med Virkon S® (27 %) jämfört med kontrollavdelningen (33 %) som ej desinficerats under tomtiden (Tabell 4). Skillnaden var dock inte signifikant, $p=0,08$.

Spädgrisdödligheten var i de båda avdelningarna 11,3 % respektive 10,6 %. Skillnaden var ej signifikant

Av totalt 55 kullar i de båda avdelningarna uppvisade 45 kullar minst en gris med diarre. Det fanns en tendens till högre dödlighet i de kullar i vilka diarre förekom (11,7 %) jämfört med i kullar utan diarre (7,4 %) (Tabell 5). Skillnaden var dock inte signifikant, $p=0,17$.

Tabell 4

Kulldata och behandlingar av sugga och smågrisar i grisionsboxar vilka behandlats respektive ej behandlats med Virkon-S under tomtiden

Virkon-S	Antal kullar	Lev. födda	Antal e. utjämn.	Döda	Behandl. suggor	Smågrisar m. diarre	Kullar m. diarrebeh.
Ja	28	353	354	40 (11,3%)	13	97 (27 %) $p=0,08$	21 (75%) $p=0,18$
Nej	27	357	359	38 (10,6%)	13	120 (33%)	24 (89%)
S:a	55	710	713	78	26	217	45

Tabell 5

Inverkan av förekomst av diarre i kullar på smågrisdödlighet och behandling av suggor

Diarreförekomst i kull	Antal kullar	Levande födda	Kull efter utjämn	Döda	Behandlingar suggor
Ja	45	593	592	69 (11,7%)	23 (51%)
p-värde				$p=0,17$	$p=0,19$
Nej	10	117	121	9 (7,4%)	3 (30%)
S:a	55	710	713	78	26

Sammanfattning

Inga säkra positiva effekter på diarreförekomst och dödlighet kunde konstateras efter det att grisionsavdelningen behandlats med Virkon S® under tomtiden. Det är möjligt att upprepade behandlingar krävs mellan flera på varandra följande grisionsomgångar.

Referenser

1.

- Bueschel D.M., Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Songer J.G. 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Veterinary Microbiology* 94; 121-129
- 2.
- Collins J.E., Bergeland M.E., Bouley D., Ducommun A., Francis D.H., Yeske P. 1989. Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1; 352-353
- 3.
- Engström, B.E., Fermér, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Båverud, V. and Gunnarsson, A. (2003) Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Veterinary Microbiology* 94, 225-235.
- 4.
- Estrada Correa A.E., Taylor D.J. 1989. Porcine *Clostridium perfringens* type A spores, enterotoxin and antibody to enterotoxin. *The Veterinary Record* 124; 606-610.
- 5.
- Gibert M., Jolivet-Renaud C., Popoff M.R.I. 1997. Beta 2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens* *Gene* 203; 65-73
- 6.
- Klaasen H.L.B.M., Molkenboer M.J.C.H., Bakker J., Miserez R., Händi H., Frey J., Popoff M.R., van den Bosch J.F. 1999. Detection of the β_2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. *Immunology and Medical Microbiology* 24; 325-332.
- 7.
- Svendsen J., Bille N., Nielsen N.C., Larsen J.L., Riising H-J. 1975. Prewaning mortality in pigs 4. Diseases of the gastrointestinal tract of pigs. *Nord. Vet.-Med.* 27; 85-101.
- 8.
- Taylor D.J. 1995 *Pig Diseases* 6th ed. 111-113

Publicering av erhållna resultat

Vid 19:e IPVS kongressen i Köpenhamn 16 – 19 juli 2006 kommer följande publikationer att presenteras;

Holmgren N, Segall T, Båverud V, Lindberg A and A. Linder.
Clostridium perfringens type A in neonatal piglets without diarrhoea symptoms

Holmgren N, Båverud V, Lindberg A and A. Linder.

Clostridium perfringens type A from indoor and outdoor sows and piglets

En större publikation i internationell vetenskaplig tidskrift kommer därefter att göras.

En sammanställning av hittills gjorda arbeten som vi gjort avseende *Clostridium perfringens* typ A hos spädgrisar kommer att presenteras för producenter, rådgivare och svinveterinärer i samband med nästa konferens som anordnas av Svenska Djurhälsovården.