

Patogenes, karakteristik och diagnostik av dysenteri, spiroketal diarré och proliferativ enteropati hos svin

Bakgrund

Svindysenteri, spiroketal diarré och proliferativ enteropati är diarrésjukdomar som finns i alla länder där grisar produceras, inklusive Sverige. Svindysenteri är en allvarlig svinsjukdom som orsakar blodblandad diarré och hög dödlighet om inte behandling sätts in. Den orsakas av bakterien *Brachyspira hyodysenteriae*. Spiroketal diarré orsakas av *B. pilosicoli* som är allmänt spridd i den svenska grispopulationen. Spiroketal diarré kan beskrivas som en mild form av svindysenteri. Symtomen vid proliferativ enteropati är diarré och att grisar "faller ur" och blir pellar. Smittämnet är allmänt spritt i svenska svinbesättningar. Sjukdomen orsakas av bakterien *Lawsonia intracellularis*. För samtliga tre beskrivna sjukdomar gäller att de sjukdomsframkallande mekanismerna är ofullständigt kända.

Att eliminera de diarréframkallande bakterierna från alla drabbade svinbesättningar är orealistiskt. Vacciner mot dysenteri och dysenteriliknande sjukdomar skulle därför kunna få ett stort värde. Ökande resistens har lett till att idag finns endast ett antibiotikum tillgängligt vid behandling eller sanering av besättningar drabbade av svindysenteri. Svindysenteri och dysenteriliknande sjukdomar utgör därför hot mot svinproduktionen. Diagnostiken av *B. hyodysenteriae* och *B. pilosicoli* har begränsningar eftersom den är långsam, arbetskrävande och kostsam, samt att den kräver att bakterierna odlas fram från träckprover.

I ett samarbete mellan SVA, SLU och KTH har tidigare ett släkträd för släktet *Brachyspira* fastställts och en relevant diagnostik avseende *Brachyspira*-infektioner kunnat utvecklas. Forskargruppen har också utvecklat en molekylär "fingerprinting"-metod (pulsfältsgelelektrofores) för svindysenteri som bl. a. möjliggör smittspårning vid utbrott, samt en modell för försöksinfektioner som används för att studera de sjukdomsframkallande faktorerna hos *B. hyodysenteriae*. Forskning om *Brachyspira*-bakterier och sjukdomar orsakade av dessa bakterier har pågått i Sverige vid SVA/SLU sedan 1992 och har hittills resulterat i 3 doktorsavhandlingar, ett stort antal vetenskapliga artiklar och kongressaktiviteter, samt initierat en serie av internationella forskningskonferenser. För tillfället pågår 6 doktorandprojekt inom ämnesområdet vid SLU/SVA och dessutom är ett flertal seniora forskare från olika forskningsinstitutioner anslutna till nätverket. Nuvarande forskningsaktiviteter berör i första hand *Brachyspira*-infektioner hos grisar, fåglar och människor. Fokus är lagt på diagnostik, fylogeni (släktförhållanden), patogenitet, "host response" och resistensmekanismer mot antibiotika hos bakterierna. Dessutom pågår sedan många år ett samarbete med utländska grupper, bland annat från Skottland, Australien, Tyskland och USA.

Ingående information om *Brachyspira* och om forskargruppens arbete finns på gruppens hemsida: www.brachyspira.se

Mål

För att kunna eliminera smittämnen från drabbade besättningar och förebygga smittspridning till osmittade besättningar krävs en diagnostik som är känslig, specifik och kostnadseffektiv. För att kunna bekämpa svindysenteri, spiroketal diarré och intestinal spiroketos i besättningar där smittämnen inte går att eliminera, krävs ingående kunskaper om sjukdomarnas epidemiologi och dess predisponerande faktorer. Det aktuella projektet innebar att utveckla diagnostiken och öka förståelsen om sjukdomarnas bakomliggande faktorer.

Material och metoder

För projektet beviljade SLU löne-medel under 5 år (80 % forskning) för en doktorand, Therese Råsbäck, som tillträdde sin tjänst 2002-02-01. SLU beviljade dock inga driftmedel eller medel för nödvändig biomedicinsk analytikerhjälp. Therese Råsbäck har parallellt med forskningsarbetet deltagit i fältundervisningen i grismedicin av de blivande veterinärerna. Doktoranden har arbetat på SVAs och SMIs laboratorier med en handledargrupp bestående av Claes Fellström, SLU, Karl-Erik Johansson, Anders Gunnarsson, Jens Mattson och Märit Pringle, SVA samt en statistiker, Nils Lundeheim, Svenska Djurhälsovården och SLU. Samarbete i övrigt har skett med Lunds Universitet, samt ett flertal utländska forskningsinstitutioner.

Delstudie I. Sedan 1996 har nästan alla remisser i samband med provtagning för diarré hos svin inkl. svindysenteri och dysenteriliknande sjukdomar åtföljts systematiskt insamlade anamnesticke uppgifter upptagna av veterinär vid besättningsbesök i samband med kliniskt utbrott av diarrésjukdom. Underlaget motsvarar ca 20 000 prover eller 7000 provtagningar under 6 år. Delstudie 1 innebar att redigera samtliga remisser (~7000 st) och bearbeta materialet för att få en bättre uppfattning om dysenteri och dysenteriliknande sjukdomar i Sverige. I den statistiska bearbetningen har ingått att jämföra de olika diagnoserna med statistik över antibiotikaförbrukningen för substanser som används mot sjukdomarna.

Delstudie II. Att utveckla molekyllära diagnostiska system för svindysenteri och andra diarrésjukdomar via svinträck. Molekyllär diagnostik direkt från faeces har låg känslighet.. Genom användning av ett multiplexsystem kan förekomst av flera bakterier undersökas samtidigt vilket förenklar, snabbar upp och förbilligar diagnostiken. För det multiplexa PCR-systemet designades s.k. primers för *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* och *Lawsonia intracellularis*. För *B. hyodysenteriae* kan exempelvis sekvensinformation för genen för det starka hemolysinet hos denna bakterie användas, för *B. pilosicoli* ribosomgenen 16S rDNA och för *Lawsonia intracellularis* annan publicerad sekvensinformation. I delstudie 2 ingick också att utvärdera den framtagna diagnostiken i internationell ”konkurrens” genom design och genomförande av ett ring test för *Brachyspira*-diagnostik, samt att jämföra diagnostiken med den traditionella biokemiska diagnostiken som hittills tillämpats i Sverige. I delstudie 2 avsågs också att genom egna sekvenseringar av gener och andra typningsmetoder, framför allt pulsfälts-gelelektrofores och Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), få fram ny genetisk information om bakterierna för att på så sätt kunna optimera systemet och få ökad kunskap om hur *Brachyspira*-bakterier skall klassificeras/diagnosticeras.

Delstudie III. Ett försök att med proteomik beskriva antigener som skulle kunna användas för utveckling av ny diagnostik och vaccinförställning mot svindysenteri. Proteomik applicerat i detta sammanhang innebär att bakteriernas proteiner får vandra i en tvådimensionell gel. Geler från olika arter av bakterier jämförs och på så sätt kan proteiner som är specifika för sjukdomsframkallande arter identifieras. Med hjälp av masspektrometri kan proteinerna karakteriseras och genom aminosyrasekvensering kan generna för dessa proteiner beskrivas. Avsikten är att skapa underlag för utveckling specifik serologi och utveckling av effektiva vacciner. Gensekvenserna för proteinerna kan också användas för utveckling av molekyllärbiologisk diagnostik. Proteomik är ett system av tekniker som idag med stor framgång används inom en rad områden inom mikrobiologi.

Delstudie III innebar också att karakterisera det humoral immunsvaret vid svindysenteri. Arbetet som genomförts inom delstudie III har skett samarbete med professor Lars Engstrand vid Smittskyddsinstitutet, Åke Engström vid proteomikplattformen vid Uppsala Universitet,

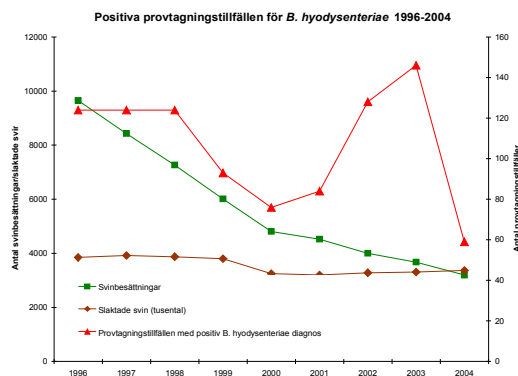
Jens Mattson, Avdelningen för parasitologi, SVA/SLU, samt med Robert Jonasson, Kliniska Vetenskaper, SLU (doktorand i the Swedish Brachyspira Working Group).

I studien jämfördes de fem typstammarna av släktet *Brachyspira* som omfattar både sjukdomsframkallande och icke sjukdomsframkallande arter. Studien inleddes med studier på endimensionella geler och därefter tvådimensionella geler. Så kallade ”spots” (punkter på gelerna som ses för *B. hyodysenteriae* men inte för icke sjukdomsframkallande arter) valdes ut för vidare analys med masspektrometri/aminosyrasekvensering.

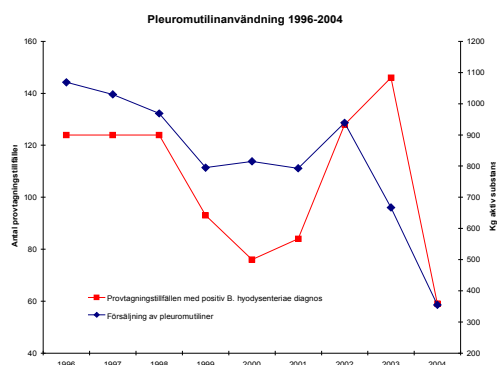
Resultat (avser de viktigaste resultaten)

Delstudie I.

Från 1996 finns alla *Brachyspira*-provtagningar i Sverige registrerade och i Figur 2 framgår antalet tillfällen där *B. hyodysenteriae* kunnat påvisas.



Figur 1. Antalet provtagningstillfällen där *B. hyodysenteriae* kunnat påvisas, antalet grisbesättningar samt antalet slaktade grisar i tusental i Sverige 1996-2004.



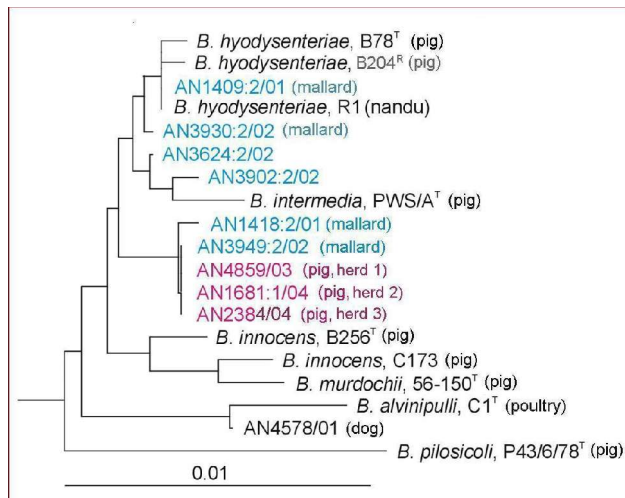
Figur 2. Antalet provtagningstillfällen där *B. hyodysenteriae* kunnat påvisas, samt årlig försäljning av pleuromutiliner för gruppbehandling i Sverige 1996-2004 (Apoteket AB)

I Figur 2 kan utläsas att antalet provtagningstillfällen under åren 1996-2000 där *B. hyodysenteriae* kunnat påvisas, i stort sett följer kurvan för antalet grisbesättningar i Sverige. Under åren 2001-2003 sker en markant ökning, varefter siffran dramatiskt minskar under år 2004. Antalet positiva provtagningar sammanfaller i hög grad med förbrukningen av pleuromutiliner, som är ”drug of choice” i samband med svindysenteri.

När analysen tillämpades på *B. pilosicoli* kunde inte motsvarande samband konstateras.

Delstudie II.

Ett duplex PCR-system för *B. hyodysenteriae* och *B. pilosicoli* (spiroketal diarré) har tagits fram. Detta innefattar design av sk primers, anpassning av systemet så att båda bakterierna kan analyseras samtidigt samt en utvärdering av systemet. Utvärderingen/kontrollen har innefattat jämförelse med befintlig diagnostik som baseras på traditionell odling av bakterierna, applicering av metoden på ett stort antal *Brachyspira* isolat från olika djurslag, ffa gris och fjäderfä, samt grisisolat från andra länder. Metoden har testats parallellt med andra molekylära system utvecklade utomlands. I dessa tester har det svenska systemet visat sig ha högst specificitet. Forskargruppen har organiserat två sk ringtest med "blinda" träckprover "spikade" med *Brachyspira* bakterier i olika koncentrationer, där laboratorier från 7 länder inom unionen ingått. I dessa tester fungerade den svenska diagnostiken utan fel och med hög känslighet. PCR-systemet används nu för att kontrollera alla bakterieodlingar positiva för *B. hyodysenteriae* i rutindiagnostiken vid SVA. PCR systemet är utprovat direkt på träck vilket gör det möjligt att få ett positivt svar inom 1-2 dygn. Känsligheten är dock låg vid sådan applicering (10 milj bakt/g träck), dvs endast akut sjuka grisar kan detekteras. Betydligt känsligare blir systemet om det körs efter 3 dagars odling. När det gäller specificitet och sensibilitet är PCR-metoden klart jämförbar med traditionell odling när den appliceras på primärkulturer. Att utöka systemet till att även inkludera även *Lawsonia intracellularis* genomfördes inte eftersom redan 2 primerpar i systemet visade att konkurrens uppstod mellan dessa och risk kan då uppstå att man erhåller falskt negativa provsvar för någon av de ingående bakterierna.



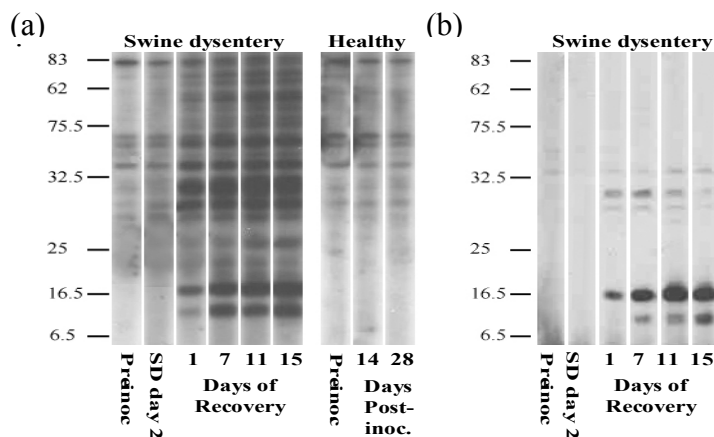
Figur 3. Ett fylogenetiskt träd baserat på 16S rDNA som visar att de nyupptäckta bakterierna sannolikt inte tillhör arten *Brachyspira hyopenumoniae*.

Under arbetet med att testa specificiteten för den nya diagnostiken upptäcktes en ny genetisk variant av sjukdomsframkallande *Brachyspira*-bakterier med en fenotyp liknande *B. hyodysenteriae*. Bakterien kunde isoleras i tre grisbesättningar i södra Sverige som hade ett epidemiologiskt samband. Eftersom denna variant testades negativt i samtliga beskrivna PCR-system, samtidigt som den isolerades från fall med klinisk svindysenteri, ansågs det nödvändigt att göra en speciell studie för att karakterisera dessa bakterier. Sekvensanalys av 16S rDNA och nox-gener visade att den nya varianten inte kan klassificeras som *B. hyodysenteriae* och att den genetiskt är mycket lik *Brachyspira*-bakterier som forskargruppen tidigare isolerat från gräsänder. Tilläggsmedel söktes därför från Formas för att genomföra en challengestudie på grisar för att studera bakteriens patogenitet. Förutom med den aktuella bakteriestammen, infekterades grisar med en analog *Brachyspira*-stam isolerad från gräsand.

samt en typstam för *B. hyodysenteriae*, B204. I samtliga försöksgrupper blev grisar infekterade och utvecklade diarré eller svindysenteri, medan kontrollerna förblev friska. Samtliga bakteriologiska undersökningar som utförts i samband med challengeförsöket och vid typningsstudierna har finansierats via SLF-anslaget.

Delstudie III.

Helcellsproteiner från *Brachyspira*-bakterier av olika arter separerades på endimensionella geler som helcellspreparationer (SD page). Dessa har immunoblottats med absorberade konvalescens-sera från grisar som ingått i challengeförsök med *B. hyodysenteriae*, samt med hyperimmuna sera mot *B. hyodysenteriae*, *B. innocens* och *B. aalborgi*. Även hyperimmunt *B. hyodysenteriae* sera absorberat med *B. innocens* användes vid blottningen. Resulten visar klart att grisar som insjuknar i svindysenteri utvecklar ett humoralt immunsvär, där åtminstone tre specifika proteiner kan identifieras (se figur 4). Resultaten visar också att *Brachyspira*-arterna korsreagerar starkt mellan arterna. Absorberade sera ger upphov till enstaka band (se figur 4). Nästa steg i studierna innebar att blotta tvådimensionella geler med absorberade hyperimmuna sera. För detta beställdes hyperimmuna sera från samtliga *Brachyspira*-arter, framställda på kanin. För att separera de band som setts på en-dimensionella gelerna blottades helcellsproteiner från *B. hyodysenteriae* på tvådimensionella geler mot absorberade konvalescens-sera från challengeförsök med *B. hyodysenteriae*. Enstaka "spots" identifierades, skars ut och analyserades med MALDI. Tyvärr visade det sig att mängden protein som kunde fås via tvådelsgeler inte räckte för MALDI-analys. Flera försök till anrikning av de immunogena proteinerna med hjälp av affinitetskolonner där antikropparna i absorberat konvalescent sera binder fast de immunogena proteinerna gjordes. Det visade sig dock att proteinerna inte band starkt nog till antikropparna för att dessa skulle fastna och anrikas.



Figur 4 . Immunoblot på helcellsproteiner från *B. hyodysenteriae* separerade via SDS page, och inkuberade med serum från grisar före och efter de inokulerats med *B. hyodysenteriae*. a) Serumantikroppar bundna till helcellsproteiner från *B. hyodysenteriae* (B78¹). b) *B. hyodysenteriae*-specifika antigen i sera efter absorption med *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*, *B. pilosicoli* och *B. aalborgi*. Till vänster ses molekylära storleksmarkörer (kDa).



Figur 5. Två-dimensionell gel med *B. hyodysenteriae*. Här ses tydligt olika proteiner i punkter, organiserade efter isoelektrisk laddning och storlek på proteinerna. Till höger ses en storleksmarkör.



Fig 6. Två-dimensionell gel som är immunoblottad med absorberat konvalescent sera. Enstaka proteiner har reagerat med grisens antikroppar. Dessa proteiner har vi försökt vi identifiera.

Diskussion

Den statistiska bearbetningen som gjorts av samtliga svenska remisser med frågeställningen svindysenteri 1996-2004 visar entydigt att sjukdomen kraftigt minskat som ett problem i Sverige. En utav orsakerna till detta torde vara den utveckling/förbättring av de diagnostiska metoderna som skett vid SVA och som möjliggjorts tack vara de forskningsprojekt som genomförts av forskargruppen. En bra diagnostik är en förutsättning för de övervakningsprogram som nu finns etablerade. Samtidigt visar våra resultat att diagnostiken även fortsatt måste utvecklas och ifrågasättas. I det här projektet kunde vi identifiera en ny typ av sjukdomsframkallande *Brachyspira*-bakterier hos gris som än så länge enbart kan identifieras om både traditionell och ny diagnostik tillämpas samtidigt. Studierna visar också att fåglar utgör en potentiell risk för grisar när det gäller smitta av sjukdomsframkallande *Brachyspira*-bakterier.

I de tidigaste studierna som gjordes för att identifiera potentiella vaccinkandidater för svindysenteri beskrevs flera av de band vi nu ser vid endimensionella blottningar av *B. hyodysenteriae*. Då dessa tidiga försök gjordes användes troligen *B. hyodysenteriae* isolat som senare visat sig vara sig icke rena *B. hyodysenteriae* isolat eller till och med en annan art än vad som avsetts (opublicerad information från tidiga egen studier). Dessa isolat användes olyckligtvis i vissa studier utförda av andra forskargrupper, vilket enligt forskargruppens hypotes gav upphov till missledande resultat. Dessutom användes huvudsakligen cellväggproteiner för analys, vilket kan ha varit en begränsade faktor för att rätt protein skulle identifieras. En av våra hypoteser har därför varit att även andra proteiner än

cellväggspoteiner kan utlösa ett humuralt svar. Detta styrks ytterligare i en ny undersökning där en forskargrupp via monoklonala antikroppar identifierat vissa av de starka banden på endimensionella geler, och visat att dessa har klar relation till tillfrisknande efter svindysenteri. Tyvärr lyckades vi inte pga. tekniska svårigheter klargöra karaktären på de aktuella proteinerna. En ytterligare begränsning är att genomet för *B. hyodysenteriae* inte är sekvenserat, vilket försvårar identifieringen av proteinerna. I framtida studier skulle man kunna gå vidare med cloning av cDNA bibliotek och fag-display. Det kloner som reagerar med antikroppar kan sekvenseras och via sekvenser kan man försöka få fram hela koden för proteinet. Via sekvensen kan man sedan lätt att tillverka tillräckligt med protein för, tex ELISA eller vaccinförök.

Sammanfattningsvis så har studierna resulterat i en omfattande ny och värdefull kunskap när det gäller svindysenteri och dysenterilikhande sjukdomar hos gris. Forskargruppen har dessutom på ett påtagligt sätt utökat sin kompetens när det gäller tillämpning av proteinkemi och nya molekylärbiologiska metoder när det gäller studier av sjukdomsframkallande bakterier.

Litteraturförteckning (publikationer över studier helt eller delvis finansierade av SLF inom projektet)

Publikationer i vetenskapliga tidskrifter med peer review-förfarande

Jansson, D. S., K.-E. Johansson, T. Olofsson, T. Råsbäck, I. Vågsholm, B. Pettersson, A. Gunnarsson, and C. Fellström. 2004. *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly β -hemolytic and indole positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). J. Med. Microbiol. 53:293-300.

Råsbäck, T., Fellström, C., Bergsjø, B., Cizek, A., Collin, K., Gunnarsson, A., Jensen, S. M., Mars, A., Thomson, J., Vyt, P., Pringle, M. A ring test for diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species. Vet. Microbiol. 2005 Aug 30;**109(3-4):229-43.**

Fellström, C., Råsbäck, T., and Gerth Löfstedt, M. Svindysenteri I Sverige - historik, bekämpning och framtidsutsikter. Svensk Veterinärtidning, 8-9, 2005.

Jonasson R., Andersson M., Råsbäck T., Johannison A., Jensen-Waern M. J. Immunological alterations during the clinical and recovery phases of experimental swine dysentery. J. Med. Microbiol. 2006. Accepted.

Råsbäck T, Jansson S D, Johansson K-E, Fellström C. Candidatus 'Brachyspira suanatina', a novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pigs and mallards. Submitted.

Konferensrapporter

Fellström, C., T. Olofsson, B. Pettersson, S. Ahrné, G. Molin, A. Gunnarsson, and K.-E. Johansson. 2003. A comparison of 16S rDNA sequencing, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for classification of porcine *Brachyspira* species. Abstract no. 2. In Proceedings of the Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Eddleston, Scotland, UK.

Råsbäck, T., M. Karlsson, C. Fellström, U. Zimmerman, and A. Gunnarsson. 2003. A laboratory diagnostic ring trial for *Brachyspira* species, possibilities and pitfalls, Abstract no.

24. In Proceedings of the Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Eddleston, Scotland, UK.

Fellström, C., D. S. Jansson, T. Råsbäck, B. Pettersson, K.-E. Johansson, T. Olofsson, J. Thomsson, A. Gunnarsson, and S. Ahrné. 2003. Emended description of strongly hemolytic intestinal spirochaetes, Abstract no. 29. In Proceedings of the Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Eddleston, Scotland, UK.

Murray, D. H., B. P. Murray, K.-E. Johansson, J. Dick, T. Olofsson, B. Pettersson, K. Sumption, S. Ahrné, T. Råsbäck, J. Thomson, and C. Fellström. 2003. Characterisation of a group of atypical *Brachyspira hyodysenteriae* isolates, Abstract no. 30. In Proceedings of the Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Eddleston, Scotland, UK.

Råsbäck, T., C. Fellström, A. Gunnarsson, and A. Aspan. 2003. Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* by a duplex PCR system. Abstract no. 51. In Proceedings of the Second International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Eddleston, Scotland, UK.

Råsbäck, T., C. Fellström, A. Gunnarsson, and A. Aspan. 2004. A duplex PCR system in comparison with culture and biochemical tests for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*, p. 246. In Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg, Germany.

Råsbäck, T., L. Melin, N. Lundeheim, A. Gunnarsson, and C. Fellström. 2004. Isolation of *Brachyspira* species in a Swedish pig herds with diarrhoea 1996-2003, p. 286. In Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg, Germany.

Jansson, D. S., T. Råsbäck, B. Båverud, M. Pringle, L.-G. Larsson, A. Gunnarsson, K.-E. Johansson, and C. Fellström. 2004. Atypiskt svindysenteriutbrott - möjlig spridning från vilda fåglar, p. 200. In Proceedings of Jordbrukskonferensen. SLU, 23-24 nov., Uppsala, Sweden.

Fellström, C. 2005. Swine dysentery, diagnostics and control. Abstract no. 18. In Proceedings of the Third International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Parma, Italy.

Rasback, T., Jansson, D.S., Johansson, K.-E., and Fellström, C. 2005. New isolates of strongly haemolytic spirochaetes dissimilar to *Brachyspira hyodysenteriae*. Poster abstract no. 9. In Proceedings of the Third International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Parma, Italy.

Jonasson, R., Andersson, T., Rasback, T., Johannisson, A., Fellström, C., and Jensen-Waern, M. 2005. Cellular and immune alterations during the clinical and recovery phases of experimental swine dysentery. In Proceedings of the Third International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Parma, Italy.

Övriga publikationer

Fellström, C., K.-E. Johansson, M. Jacobson, M. Pringle, T. Råsbäck T, M. Andersson, R. Jonasson, M. Jensen-Waern M, A. Gunnarsson, and D. S. Jansson. 2004. Brachyspira- och Lawsoniainfektioner hos svin och fjäderfä, pågående projekt vid SLU/SVA, p. 197. In Proceedings of Jordbrukskonferensen. SLU, 2004, 23-24 nov., Uppsala, Sweden.

Fellström C, Jacobson M, Råsbäck T, Jensen-Waern M. Diaree hos svin- pågående projekt vid institutionen för kirurgi och medicin stordjur. In Proceedings of Jordbrukskonferensen 19-20 November, SLU, 2002. Poster presentation. p 214.

Fellström C. Svindysenteri i Sverige – ett lyckat exempel på sjukdomsbekämpning. Svensk Gris 9-2005, 28-30.