

SLUTRAPPORT:
Luftvägsinfektioner hos gris med särskild inriktning på
Actinobacillus pleuropneumoniae

Per Wallgren¹, Caroline Fossum², Anders Gunnarsson³,
Anna Aspan⁴, Göran Karlsson⁵ och Gunnar Bergström⁶

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

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

³VMD, Laborator, Enh f bakteriologi, SVA, 751 89 Uppsala

⁴PhD, Forskare, Enh f bakteriologi, SVA, 751 89 Uppsala

⁵Djurhälsoveterinär, Svenska Djurhälsovården, Malmen Hållsta, 635 18 Eskilstuna

⁶Chefveterinär, Svenska Djurhälsovården, 532 89 Skara

Bakgrund

Denna rapport beskriver ett relativt stort och långsiktigt projekt som belyser luftvägsinfektioner hos grisar. Forskargruppen har sedan tidigare en väletablerad kontakt och 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

APP serotyp ->	1	2	3	4	5a, b	6	7	8	9	10	11	12
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	-	-

Slutrapport 2008-07-15

Detta forskningsprojekt har framskridit planenligt. Under en period försenades projektet till följd av förändringar vid SLU, men det löper nu återigen klanderfritt sedan en doktorand kunnat anställas inom ett fortsättningsprojekt finansierat av SLF (Projekt V0550125). Denna doktorand, veterinär Marie Sjölund, kommer att disputera inom ramen för fortsättningsprojektet. Inom ramen för det här projektet har 4 artiklar sänts till internationella vetenskapliga tidskrifter, varav tre redan accepterats och två publicerats.

Därutöver har forskningsrönen presenterats i form av 6 internationella kongressrapporter vid International Pig Veterinary Society Congress under 2004-2008. Resultaten rörande pulsfältsgelelektrofores 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 fyra publikationer i fack- och lantbrukspress som anges nedan även använts flitigt vid såväl kurser som konferenser, vidareutbildningar och basutbildningar av veterinär- och agronomstudenter.

Bland viktiga erhållna resultaten kan följande nämnas där projektets olika publikationer anges inom parentes med hänсыftning till den publiceringslista som följer (Vet = artikel i vetenskapligt granskad internationell tidskrift, Congr = internationell kongressrapport, Sv = svensk publikation).

Att det inom ramen för projektet konstruerats diagnostik för samtliga serotyp 1-12 av **APP** inklusive 5a och 5b (Sv 2). Detta visade sig vara viktigt då serotyp 5 strax därefter för första gången diagnostiserades i landet. 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 (Sv 3). 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 (Sv 4) och så även i en senare 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 mikroben. 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 (Congr 4 & 7). Detta betyder att antingen har en närmast identisk mutation inträffat hos denna bakterie som förvisso är mycket förändringsbenägen (därav 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. Den genomförda studien visade även att akutfasset kunde lindras vid snabbt insatt och effektiv behandling (Vet 1). **APP**-infektioner visade sig även påverka tarmfloran negativt, sannolikt genom den allmänpåverkan som infektionen medför (Vet 2). 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. 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 (Vet 3, Congr 5). Inom ramen för praktisk produktion kan man troligen inte räkna

med att sjuka djur behandlas så snabbt att ett antikroppssvar blockeras, men observationen äger stor relevans vad gäller profylaktisk behandling av ännu inte insjuknade djur. (Inom ramen för fortsättningsprojektet kommer vi även att studera akutfasproteinernas mönster i samband med en reexponering för **APP**).

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 pulsfältsgелеlektroforesundersökningar har vi dock visat att de stammar tillhörande serotyp 2 som isoleras idag är identiska med dem som isolerades på 1970-talet (Congr 4 & 7). 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 sådan strategi 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. Under vaccinationsfasen förekom regelrätta utbrott med **APP**, men sedan vaccinationsprogrammet avslutats efter det att en ”turnover” av alla djur i enhetens åtta olika avdelningar vaccinerats med start vid ankomst så sjönk pleuritfrekvensen vis slakt markant (Congr 6). Möjligen hade smittrycket sänkts, men metoden bör testas ytterligare. Sannolikt bör även vaccinationstidpunkten optimeras så att djuren förväntas vara immuna redan vid ankomst ytterligare, något som dessvärre kan ställa till logistiska problem i besättningar som inte är helintegrerade.

Det maternella skyddet mot **APP** har studerats i en problembesättning (Vet 4, Congr 3, Sv 1). Suggor utgör en heterogen grupp som svarar med olika höga nivåer av antikropps bildning trots att de vistas i samma miljö. Detta återspeglas även i den råmjölksförmedlade immuniteten hos smågrisarna, där avkomman till ”high responders” erhåller ett betydligt bättre skydd än avkomman till ”low responders”. Detta kan ha en praktisk implikation då suggans egen immunitet sjunker i samband med grisning pga förflyttning av cirkulerande antikroppar från blodet till råmjölken. Möjligtvis kan 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 (Vet 3), 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 (Congr 1). Därefter kan en infektionskaskad uppstå där i praktiken inte alltid är lätt att särskilja **APP** från andra primär- och sekundärpatogena sjukdomar (Congr 2). För att följa detta förlopp är den ELISA som konstruerats för att följa utvecklingen rörande sekundärinfektioner orsakade av *Pasteurella multocida* av stort värde. (Congr 1)

Detta projekt har direkt övergått i ett fortsättningsprojekt (SLF Projekt V0550125) där de frågetecken som återstår penetreras. Det projektet följer plan och kommer att slutredovisas år 2010 och detta år beräknas även veterinär Marie Sjölund disputerar inom projektet

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
- 2) 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.
- 3) **APP**-stammar som isolerats vid olika tidpunkter är jämförda och det har fastslagits att de stammar av serotyp 2 som cirkulerar idag är identiska med isolat från 1970-talet
- 4) 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
- 5) Det sekundära immunsvaret, dvs vid en återinfektion med **APP**, och hur/om djuren utvecklar och bevarar en immunitet mot sjukdomen är dokumenterat
- 6) Den maternella immuniteten avseende **APP** har studerats och vi har dokumenterat skillnader i denna mellan avkommor till "high responders" och "low responders"
- 7) Infektionsdynamiken vad gäller **APP** är studerat i en problembesättning hos såväl diande grisar som hos slaktsvin och i dessa studier har även tagits hänsyn till sekundärinfektioner, liksom djurens immunkapacitet (avkomma till "high" eller "low responder").
- 8) Genomfört en klinisk prövning av en ny vaccinationsstrategi i en besättning med problem med **APP**

Naturligtvis kommer en del av dessa problemställningar att belyses ytterligare inom ramen för det fortsättningsprojekt (SLF V0550125) som pågår.

Publikationer inom projektet

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 digestability 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. Fossum⁴ and P. Wallgren (2008) The effects of a challenge infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs treated with antibiotics at the primary infection. Vet. Rec. Accepted for publication.
- 4) Sjölund, M., M. Zoric, M. Persson and P. Wallgren (2006) Colostral transfer of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 to the offspring of sows with high and low levels of serum antibodies. Submitted for publication

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) Wallgren, P and A. Aspán (2008). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. A comparison of Swedish isolates of serotype 2 and 5 over time. Pig J, In press

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 soggans 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.

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

Veterinär Marie Sjölund kommer att disputera inom ramen för fortsättningen till detta projekt och i sin avhandling även att ha med delar av de arbeten som här presenterats.