

SLUTRAPPORT

Projektnummer V0550035

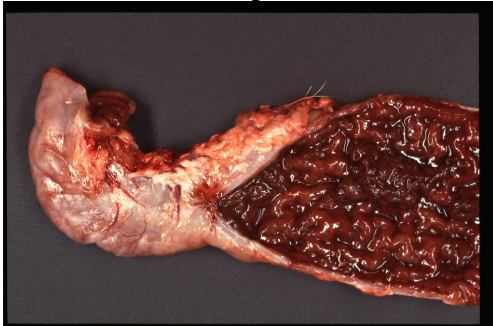
AKUTA BLÖDNINGAR OCH DÖDSFALL HOS GRIS VID SJUKDOMEN PROLIFERATIV ENTEROPATI – EN ÖVERREAKTION HOS IMMUNSYSTEMET?

Projektet har tyvärr blivit kraftigt försenat på grund av att två nyckelpersoner, som ansvarat för delar av metodutvecklingen, har slutat och inte omedelbart kunnat ersättas. Vidare har den doktorand som ansvarat för stora delar av metodiken varit ”mammaledig” under ett år. Vi ber om ursäkt för dessa förseningar och de modifieringar i försöksplanen som vi blivit tvungna att göra. Icke desto mindre är resultaten i vår studie mycket intressanta.

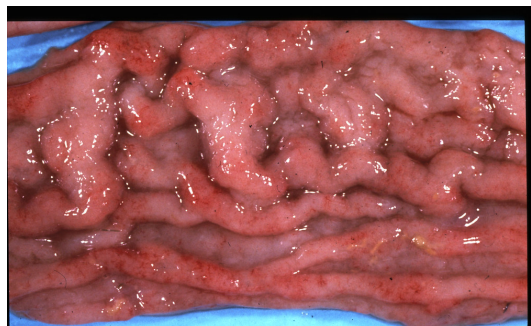
Bakgrund

Proliferativ enteropati orsakas av bakterien *Lawsonia intracellularis*. Sjukdomen är en av de viktigaste orsakerna till tarmstörningar och dålig tillväxt hos växande grisar och är påvisad i 48 % av svenska smågrisproducerande besättningar (1). Den medför ett avsevärt lidande för djuren och stora ekonomiska förluster för producenten på grund av ökad dödlighet, försämrad tillväxt och ökade kostnader för medicinering (2, 3). Bakterien är mycket svår att odla, varför diagnostik framförallt baseras på obduktion eller specifik PCR undersökning (polymerase chain reaction) (4). Sjukdomen förekommer i akut och kronisk form. Inkubationstiden är 2-3 veckor och den kroniska formen (PIA, porcine intestinal adenomatosis) drabbar ofta grisar 3-4 veckor efter avvänjning (5, 6). Djuren insjuknar med gråbrun diarré och försämrad tillväxt. Dödligheten är generellt låg och framförallt förknippad med olika sekundära infektioner (7). Den akuta formen (PHE, proliferativ hemorragisk enteropati) drabbar vanligen lite äldre djur såsom större slaktsvin eller gyltor (8). Denna form förlöper med kraftiga blödningar till tarmen. Plötsliga dödsfall kan ses där obduktion avslöjar ett blekt, blodfattigt kadaver och blodfyllda tarmar. I mindre akuta fall ses blodig diarré och mer eller mindre påverkat allmäntillstånd (9). I Sverige ses denna form framförallt som plötsliga dödsfall hos enstaka slaktsvin eller sporadiskt i smågrisproducerande besättningar där unga gyltor drabbas med blodiga diarréer och hög dödlighet (<50 %). Djuret avlider vanligen av den akuta formen innan adekvat medicinering hinner sättas in eller uppnå full effekt.

Proliferativ enteropati i dess två former:



Bilden visar en uppklippt tarmbit från ett fall av den akuta formen PHE med kraftiga blödningar till tarmen



En uppklippt tarmbit från en gris med den kroniska formen PIA. Bilden visar den vulstiga, veckade slemhinnan.

Kunskapen om mekanismerna bakom sjukdomen är mycket bristfällig. Hos gris drabbar infektionen bakre delen av tunntarmen, men kan ses i hela grovtarmens längd. Bakterien infekterar de omogna tarmcellerna och stimulerar dessa till att börja dela sig. Samtidigt upphör cellernas mognadsprocess. En typisk mikroskopisk bild innefattar därför långa,

grenade tarmkryptor utlinjerade av omogna tarmceller med en ökad delningsfrekvens och avsaknad av slemceller. Vid obduktion ses detta makroskopiskt som en förtjockad, vulstigt uppdriven slemhinna (9). Vävnaden blir känslig för infektion med andra bakterier.

En central fråga är varför en gris drabbas av den akuta eller den kroniska formen. Bane *et al.* rapporterar att båda formerna av sjukdomen aldrig ses i en besättning samtidigt (10). Generellt anses PHE vara vanligare i besättningar med god hälsostatus, t.ex. SPF-besättningar (11). En vanlig åsikt är att PHE beror på en överreaktion hos kroppens immunförsvar (9, 12). Andra hypoteser är att olika bakterieisolat varierar i sjukdomsframkallande förmåga eller att PHE beror på skillnader i infektionsdos (9). Ingen av dessa hypoteser har hittills kunnat verifieras. Sjukdomen orsakar endast en svag ökning av inflammatoriska celler i den skadade vävnaden, och ett stort intresse riktas därför mot de cytokiner som styr tarmens immunsvär. Cytokiner är lösliga signalsubstanser som stimulerar eller hämmar kroppens immunsvär beroende på hur infektionen utvecklas. Vissa cytokiner frisätts från skadad vävnad och attraherar en speciell typ av vita blodkroppar till skadan. Dessa producerar sedan nya cytokiner som i sin tur påverkar andra delar av immunsystemet. Cytokiner stimulerar och attraherar även en typ av immunceller (makrofager) som har till uppgift att äta upp och förstöra främmande material som till exempel bakterier. Man har visat att möss som saknar förmåga att reagera på ett speciellt cytokin (IFN- γ) drabbas av utbredda skador och ökad dödlighet vid infektion med *L. intracellularis*, jämfört med infekterade normala möss (13). Vissa författare menar att bakterien själv utvecklat mekanismer som undertrycker kroppens normala immunsvär (14). Det är därför viktigt att ta reda på hur tarmens immunsvär ser ut vid infektion med *L. intracellularis*, eftersom detta i sin tur avgör hur ett vaccin skall utformas för att fungera optimalt och kunna ge maximalt skydd. Det nuvarande vaccinet stimulerar naturlig immunitet genom att orsaka en begränsad infektion i tarmen. Vaccinet anges ge mikroskopiska skador i tarmen men detta har ingen negativ klinisk effekt (15). I ett kliniskt försök sågs emellertid ingen skillnad mellan vaccinerade och ovaccinerade djur avseende utveckling av cirkulerande antikroppar i blodet eller urskiljning av bakterien i faeces (16).

Syfte

En ökad förståelse för de mekanismer som leder fram till sjukdom är nödvändigt för att kunna utveckla god profylax (vacciner, rekommendationer beträffande djurflöden och smittskydd, predisponerande faktorer med mera). Detta är särskilt viktigt eftersom det snabba förloppet vid PHE vanligen omöjliggör en effektiv medicinerig. Då hälsoläget i svenska besättningar ständigt förbättras, är det viktigt att utveckla god profylax och bra rutiner för att förhindra att PHE ökar. Syftet med studien är att analysera ett flertal cytokiner i tarmmaterial dels från grisar med den akuta formen PHE och dels från grisar med den kroniska formen PIA.

Material och metoder

Etiskt tillstånd

Etiskt tillstånd finns från Uppsala Djurförsöksetiska Nämnd (diarienummer C 44/5).

Försöksdesign

Ursprungligen avsågs att studera 10 grisar med kliniska symptom på PIA och 10 grisar med kliniska symptom på PHE. Det har visat sig svårt att få in material från grisar med akut PHE och inkomna fall har framförallt varit självdöda djur. För cytokin-analys krävs att materialet är helt färskt, d.v.s. insamlats från djur som avlivats i direkt anslutning till provtagningen. Fortlöpande kontakter togs med veterinärer verksamma inom Svenska Djurhälsovården AB och ett flertal annonser infördes i tidningen Svensk Gris med knorr. Provinsamlingsperioden förlängdes med

2 år och slutligen insamlades material från totalt 4 sådana fall. Efter samråd med stiftelsen Albert Hjärre, som finansierat denna del av projektet, modifierades försöksplanen och fokuserades på grisar med den kroniska formen av sjukdomen (PIA) och som jämförelsematerial, kliniskt friska grisar i motsvarande ålder och från samma besättningar. Det slutligen erhållna materialet inkluderade 15 grisar med kliniska symptom på PIA, 10 kliniskt friska kontrollgrisar och 4 grisar med kliniska symptom på PHE, från totalt 9 olika besättningar. I en besättning insamlades prov både från gris med klinisk PHE och från gris med kliniska symptom på PIA, medan övriga grisar med klinisk PHE härrörde från specialiserade slaktsvinsbesättningar där inga PIA-fall fanns att tillgå. Från övriga fem besättningar insamlades 1 till 3 PIA-grisar och 1 till 2 kontrollgrisar. Djuren avlivades i besättningen, en enkel obduktion genomfördes omgående varvid adekvata prov togs ut. Proven transporterades till laboratorium enligt respektive analysmetod och förvarades i frys -80°C fram till analys. Inköp av grisar och insamlande av material har finansierats med medel från stiftelsen Albert Hjärre, och denna del har slutrapporterats och godkänts 5/12 2007.

Djurmaterial, klinik

Kriterier för att definiera gris med kliniska symptom på PHE: Grisen skall vara avvand och uppvisa blodig diarré. Djuret skall inte ha behandlats med antibiotika. Svindysenteri skall inte ha påvisats i besättningen.

Kriterier för att definiera gris med kliniska symptom på PIA: *L. intracellularis* skall tidigare ha påvisats i besättningen. Grisen skall vara avvand minst 2 veckor tidigare och skall uppvisa ospecifik diarré som observerats i högst en dag. Djuret skall inte ha antibiotikabehandlats.

Kriterier för att definiera en kliniskt frisk kontrollgris: Grisen skall vara av motsvarande ålder och befinna sig i samma box som PIA-grisen. Den skall ha avföring av normal konsistens och inte uppvisa några övriga tecken på sjukdom. Djuret skall inte ha behandlats med antibiotika.

Insamling av material

Samtliga djur avlivades ute i besättningen. I samband med avlivningen uttogs blodprov från *v. jugularis* för analys av cytokiner och förekomst av antikroppar mot *L. intracellularis*. En enklare obduktion genomfördes därefter och representativa prov från tarm togs ut inom 15 minuter efter avlivning. Proven togs från makroskopiskt synliga förändringar. I fall där sådana inte kunde identifieras uttogs prov från bakre delen av tunntarmen. 2-3 stycken cirka 0,5 × 1 cm stora bitar av tarmslemhinna för analys av cytokiner lades omedelbart i frysrör och sänktes ner i flytande kväve. Prov från PHE 2 och 4 frystes i -20°C. 1-2 cirka 2 × 2 cm stora bitar av tarm-slemhinna togs från intilliggande område och fixerades i 4 % formaldehyd under minst 48 timmar för ljusmikroskopi. Resterande del av förändrad vävnad och/eller bakre tunntarm (cirka 10 cm tarm) lades i plastpåse för påvisande av *L. intracellularis* med PCR.

Ljuskroskopiska undersökningar

Från varje tarmpreparat skars efter fixering 2-3 mindre preparat, innefattande hela preparatets djup. Preparaten bäddades i paraffin efter sedvanlig dehydrerings-procedur. Det paraffinerade materialet snittades i mikrotom (snitt-tjocklek 4 µm) till objektglas. Snitten färgades med hematoxylin och eosin, monterades, och undersöktes med ljusmikroskop.

*Analys av förekomst av *Lawsonia intracellularis* i tarmvävnad med PCR*

Proven förvarades vid -80°C fram till analys. Cirka 0,5 × 0,5 cm tarmslemhinna från frusen vävnad preparerades med fenol/kloroform och DNA fälldes med etanol. Varje prov analyserades med två olika metoder för påvisande av DNA, en så kallad nestad PCR (4) och en nyligen utvecklad realtids-PCR (metoden är utvecklad av forskargruppen i samarbete med

SVa och är under publicering). I de fall *L. intracellularis* DNA inte kunde påvisas, tinades tarmprovet och hela mucosan skrapades med skalpell före upprepad analys.

Analys av cytokiner i tarmvävnad

Proven förvarades vid -80°C till dess att de analyserades. Analyser gjordes avseende sex olika cytokiner, vilka tidigare visats ha betydelse i samband med andra tarmsjukdomar, nämligen IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α och TGF- β (20). Proverna analyserades i triplikat med kvantitativ TaqMan realtidsPCR och deras uttryck relativt uttrycket av ingående kontroller beräknades (21). Som kontroller användes housekeeping-generna CyclophilinA och HPRT.

Analys av förekomst av antikroppar mot Lawsonia intracellularis i serum

Vid ankomst till laboratoriet centrifugerades blodproven vid 3000 \times g i 10 min., sera pipetterades och förvarades vid -20°C. Analys skedde med en ny s.k. blocking ELISA (Svanova Biotech, Uppsala, Sweden) (18). Ett PI-värde på 35 användes som cut-off.

Analys av cytokiner i serum

Sera förvarades vid -80°C och analyserades med ett kommersiellt ELISA-kit (Quantikine Porcine Immunoassays, R & D Systems Europe limited, Abingdon, UK). Fem olika cytokiner som visats ha betydelse vid andra tarmsjukdomar analyserades, nämligen IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α och IFN- γ (19). Detektionsnivåerna av respektive cytokin låg med denna analysmetod på 10; 10; 1,8; 2,8 respektive 2,7 pg/mL.

Resultat

Djurmaterial, klinik

Sammanlagt inköptes fyra djur med kliniska symptom på PHE (PHE-gris 1 till 4). Grisarna var 14-17 veckor gamla och kom från Södermanland, Skåne, Uppland och Gotland. Ett av djuren (gris 1) kom från en integrerad besättning där *L. intracellularis* tidigare påvisats, övriga grisar kom från specialiserade slaktsvinsbesättningar. En av dessa besättningar hade tidigare haft problem med blodiga diarréer/plötsliga dödsfall (bes 4).

Totalt inköptes 15 djur med kliniska symptom på PIA (PIA-gris 1 till 15). Grisarna var 8-15 veckor gamla och härrörde från 6 besättningar belägna i Södermanland, Västmanland och Uppland. Från bes. 1 hade även en PHE-gris köpts in (se ovan).

Nio kliniskt friska kontroldjur (gris 2-7 och 9-11) köptes från PIA-besättningarna. Grisarna var 8-15 veckor gamla och härrörde från 5 besättningar belägna i Västmanland och Uppland.

Makroskopiska patologianatomiska förändringar

Grisar med klinisk PHE: Gris 1 uppvisade förändringar i främre grovtarmen med rödfärgad slemhinna och blodigt tarminnehåll. Gris 2 hade lindriga förändringar i bakre tunntarmen och blindtarmen. Gris 3 uppvisade vulstigt förtjockad, röd slemhinna i ett 3-4 dm långt tarmavsnitt av bakre tunntarmen med 0,5-1 cm stora blodkoagel adherenta till slemhinnan. Gris 4 visade rödfärgad, sönderfallande slemhinna i tunntarmen samt rosafärgad slemhinna i grovtarmen.

Grisar med klinisk PIA: 3 grisar uppvisade en vulstigt förtjockad, veckad slemhinna i bakre tunntarmen samt brunt, tunt innehåll i grovtarmen. 11 grisar hade lindrigt förtjockad slemhinna i bakre tunntarmen. 1 gris uppvisade uttänjd grovtarm men i övrigt inga förändringar.

Kliniskt friska kontrollgrisar: 7 grisar uppvisade inga makroskopiskt synliga förändringar. 2 grisar hade lindrigt förtjockad slemhinna i bakre delarna av tunntarmen.

Ljusbmikroskopiska förändringar

Grisar med klinisk PHE: Gris 1 uppvisade förstörade kryptor i grovtarmen, vilket kan ses vid svindysenteri och PIA. Gris 2 hade förändringar i blindtarm motsvarande vad som ses vid

PHE samt blödningar i lokala lymfknotor. Gris 3 uppvisade typiska förändringar (vulstig slemhinna, proppar i små kärl samt utträde av vätska och röda blodkroppar i vävnad och tarmkanal) motsvarande PHE i bakre delen av tunntarmen. Gris 4 hade en blodig tarminflammation i tunntarmen men utan typiska PHE-förändringar.

Grisar med klinisk PIA: En av grisarna med makroskopiskt tydligt förändrad tunntarm hade också markanta ljusmikroskopiska förändringar i samma tarmavsnitt. Grisen med uttänjd grovtarm hade lindriga PIA- förändringar i denna del men inga förändringar i tunntarmen. En gris med lindrigt förtjockad slemhinna i bakre tunntarmen visade med ljusmikroskopi milda PIA-skador i samma tarmavsnitt. Hos de grisar som endast uppvisat små makroskopiska förändringar sågs likaledes få ljusmikroskopiska förändringar.

Kliniskt friska kontrollgrisar: Små förändringar sågs lokalt i vävnaden med ljusmikroskopi men dessa tolkades som "bakgrundsbrus" och såsom varande inom normalvariationen.

Förekomst av Lawsonia intracellularis i tarmvävnad analyserad med PCR

Av fyra grisar med kliniska symptom på PHE, påvisades *L. intracellularis* hos två individer (gris 2 och gris 3). Av 15 grisar med kliniska symptom på PIA, påvisades bakterien hos 7 grisar. Av 9 grisar utan kliniska symptom påvisades *L. intracellularis* hos 2 djur (Tabell 1).

Tabell 1. Förekomst av DNA och antikroppar mot *L. intracellularis* hos grisar med symptom på akut eller kronisk proliferativ enteropati, samt hos kliniskt friska kontroller.

	Nestad PCR		Realtids-PCR		Serologi	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Klin. PHE (n=4)	2	2	2	2	2	-
Klin. PIA (n=15)	4	11	7	8	3	12
Kontroll (n=9)	1	8	2	7	0	9

Förekomst av antikroppar mot Lawsonia intracellularis i serum

Sera erhöles endast från två grisar med kliniska symptom tydande på PHE (gris nr 1 och nr 3). Hos båda dessa grisar kunde antikroppar mot *L. intracellularis* påvisas. Av 15 grisar med kliniska symptom på PIA, kunde antikroppar mot *L. intracellularis* påvisas hos 3 grisar. Av 9 grisar utan kliniska symptom kunde antikroppar mot *L. intracellularis* inte påvisas (Tabell 1).

Analys av cytokiner i serum

Sera erhöles endast från två grisar med kliniska symptom tydande på PHE (gris nr 1 och nr 3). Totalt 9 grisar var positiva avseende cytokinet **IL-10**. *L. intracellularis* hade påvisats i tarmvävnad hos 3 av dessa, och antikroppar hade påvisats hos 2 individer. Av de 3 grisar där halten IL-10 översteg 50 pg/mL, var samtliga positiva på PCR och/eller ELISA. Av de 6 grisar där halten IL-10 understeg 50 pg/mL, var 5 negativa på både PCR och ELISA och en gris (20 pg/mL) var endast positiv på PCR. Högsta värdet sågs hos gris "PHE-3" (74 pg/mL) som också var positiv på både PCR och serologi (Tabell 2).

Tabell 2. Höga (>50 pg/mL) respektive låga (<50 pg/mL) nivåer av IL-10 i serum hos grisar i relation till förekomsten av *L. intracellularis* eller antikroppar mot denna.

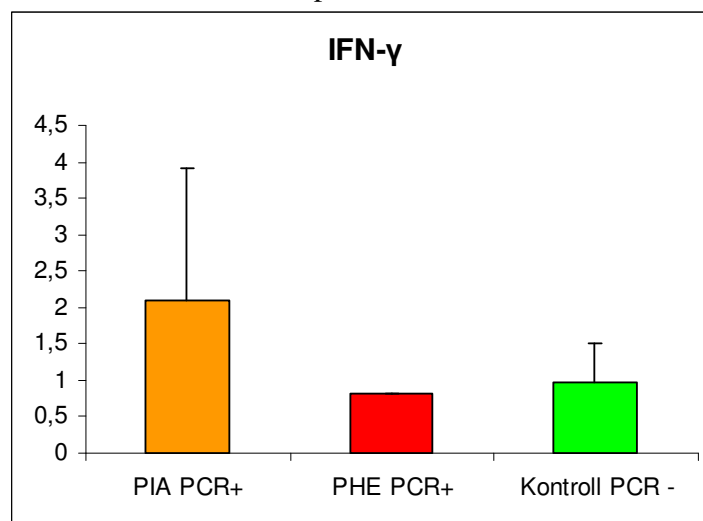
	IL-10 <50				IL-10 >50			
	PCR+ AK+	PCR+ AK-	PCR- AK+	PCR- AK-	PCR+ AK-	PCR- AK+	PCR- AK-	
PHE				1				
PIA		1		3		1	1	
Kontroller				2				

De 15 PIA-grisarna hade ett medelvärde på 16,3 pg/mL och de 10 kontrollgrisarna hade ett medelvärde på 7,06 pg/mL. En kontrollgris uppvisade en serumnivå på 46 pg/mL och en gris hade en serumnivå på 12 pg/mL, medan övriga låg under detektionsgräns (1,8 pg/mL). Sju grisar varav tre kontrollgrisar, tre PIA-grisar samt "PHE-gris 1" uppvisade förhöjda nivåer av **IL-1 β** . Med undantag för "PHE 1" varierade nivåerna mellan 11,1 och 32,2 pg/mL (detektionsnivå 10 pg/mL) och de högsta och lägsta värdena sågs hos kontrollgrisarna. Medelvärdet för PIA-grisarna var 11,4 pg/mL och för kontrollgrisarna, 11,7 pg/mL. "PHE 1", som senare visade sig ha svindysenteri, hade 130 pg/mL. Höga nivåer av **IL-6** sågs hos Gris "PHE 1" (268 pg/mL) och hos en PIA-gris (111 pg/mL). Denna PIA-gris hade diarré men var negativ både avseende PCR och antikroppar. Samtliga övriga grisar var negativa (<10 pg/mL) avseende IL-6 i serum. "PHE 1" och tre kontrollgrisar var positiva avseende cytokinet **TNF- α** med serumnivåer på respektive 40, 81, 97 och 218 pg/mL (detektionsnivå 2,8 pg/mL). Två av kontrollgrisarna var negativa på serologi och PCR medan en gris (218 pg/mL) var positiv på PCR och negativ på serologi. "PHE 1" var negativ på PCR och positiv på serologi. Ingen gris var positiv avseende **IFN- γ** (detektionsnivå 2,7 pg/mL).

Analys av cytokiner i tarmvävnad

Av grisarna med klinisk PHE kunde endast gris 1 och 3 analyseras (gris 2 och 4 gav låga eller inga utslag vid analys av kontrollerna). Jämförelser gjordes dels mellan samtliga grisar i de tre olika grupperna, och dels mellan de PIA- och PHE-grisar där *L. intracellularis* kunde påvisas med PCR, och negativa kontrollgrisar. Signifikant skillnad sågs avseende **IFN- γ** (Fig. 1). Med undantag för "PHE-gris 1" sågs inga skillnader avseende övriga cytokiner i tarmvävnad. **IL-1 β** påvisades hos 9 PIA-grisar (range 0,12-3,01), "PHE-gris 3" (1,33) och 9 kontrollgrisar (range 0,21-4,33). "PHE-1" hade kraftigt förhöjd nivå av IL-1 β (13,0). **IL-6** påvisades hos 11 PIA-grisar (range 0,26-4,11), "PHE-gris 3" (0,36) och 8 kontrollgrisar (range 0,39-1,88). **IL-10** påvisades hos 15 PIA-grisar (range 0,39-2,95), "PHE-gris 3" (1,45) och 9 kontrollgrisar (range 0,86-2,04). "PHE 1" hade 0,15. **TNF- α** påvisades hos 11 PIA-grisar (range 0,12-3,51) och 8 kontrollgrisar (range 0,41-4,66). **TGF- β** påvisades hos 13 PIA-grisar (range 0,24-3,31), "PHE-gris 3" (0,06) och 9 kontrollgrisar (range 0,33-1,98). "PHE-gris 1" hade 0,01.

Figur 1. Nivåerna av cytokinet interferon- γ i tarmvävnad från grisar med PIA (n=6), akut PHE (n=1) och friska kontrollgrisar (n=7). PCR+ indikerar att bakterien *L. intracellularis* påvisats i tarmvävnad, PCR- att bakterien inte kunnat påvisas.



Diskussion

Förvånansvärt få immunologiska reaktioner sågs, både beträffande det systemiska cytokinsvaret i blod och beträffande det lokala cytokinsvaret i tarm. Tyvärr erhöles inte prov från tillräckligt många grisar med klinisk PHE för att några säkra slutsatser skulle vara möjliga att dra beträffande denna form av sjukdomen, men få förändringar sågs i det insamlade materialet. Samma bild sågs i de prov som samlats in från grisar som insjuknat i den kroniska formen (PIA) där endast ett fåtal immunologiska reaktioner, speglade i uttrycket av cytokiner, kunde påvisas. Resultaten stämmer dock väl överens med flera andra rapporter som hävdar, att infiltration av inflammatoriska celler lokalt i tarmvävnaden saknas vid denna infektion och att *Lawsonia intracellularis* möjligen har utvecklat mekanismer för att "gömma sig" undan kroppens immunsvar (9, 14). "PHE-gris 1" som hanterats på samma sätt som övriga grisar avseende provtagning, provhantering m.m. men som visade sig ha drabbats av svindysenteri, uppvisade ett annorlunda cytokinsvar. Detta stämmer väl med vad som setts vid tidigare studier (17) och resultatet stärker ovanstående resonemang.

Klinik, patologi

Vi har tidigare visat, att kliniska symptom orsakade av *L. intracellularis* är starkt kopplat ($p < 0,001$) till förekomst av makroskopiska skador i tarmen (3). Vidare har vi visat ett starkt samband mellan makroskopiskt förändrad tarmvävnad och påvisande av *L. intracellularis* med PCR (4). Eftersom syftet med denna studie var att undersöka hur immunsystemet reagerar vid infektion med *L. intracellularis* var studiens ambition att provta djur i tidigt skede av sjukdomen. Med undantag för djuren med PHE och för PIA-grisen i besättning 1, hade inte djurägarna observerat att grisarna hade diarré utan de sjuka djuren identifierades vid besättningsbesöket. Detta besök genomfördes utifrån hypotesen att minst en gris med kliniska symptom borde kunna påvisas i en grupp grisar i lämplig ålder i besättningar med vanligtvis stora kliniska problem med proliferativ enteropati. Vidare antogs, att om inte djurägaren tidigare observerat kliniska symptom bland djuren, så borde eventuella sjuka grisar med stor sannolikhet nyligen ha insjuknat. Denna hypotes stärktes av det faktum att endast tre PIA-grisar hade tydliga makroskopiska förändringar i tarmen (den smygande utvecklingen av skadorna är väl beskrivet i litteraturen (5, 9). Hypotesen stärks ytterligare av det faktum att dessa grisar inte hade utvecklat antikroppar mot bakterien, då det tar minst två veckor från infektionstillfället till dess att antikroppar kan detekteras. Samtidigt medförde detta försöksupplägg, att påvisandet av *L. intracellularis* med PCR på tarmvävnad försvårades. Det kan finnas flera förklaringar till detta: Grisarna var infekterade av andra diarréframkallande bakterier, vilket inte undersöktes i denna studie, alternativt hade grisarna drabbats av en foderrelaterad diarré (20). Prov för PCR togs från ett cirka dm-långt avsnitt av tarmen. I de fall där makroskopiska förändringar saknades togs prov från bakre tunntarmen som är den vanligaste lokaliseringen för infektion med *L. intracellularis*. Det går dock inte att utesluta att andra delar av tarmen varit infekterade och att dessa missats vid provtagning. Besättning 1 visade sig två veckor efter provtagningstillfället vara positiv för *B. hyodysenteriae*, vilket stämmer med de makroskopiska förändringar som iaktogs hos "PHE-gris 1". Gris 4 hade våldsamt förändrade tarmar men inga tydliga proliferativa skador. Tidigare studier har visat en stark positiv korrelation ($p < 0,001$) mellan påvisande av *L. intracellularis* och förekomst av makroskopiska förändringar. Detta talar för att det finns en annan gen till den hemorrhagiska enteriten hos gris 4, och den makroskopiska bilden liknar den som ses vid "hemorrhagic bowel syndrome".

Cytokiner i serum

Stora individuella variationer sågs i uttrycket av cytokiner. Av de fem grisar som utvecklat antikroppar mot *L. intracellularis* uppvisade tre förhöjda nivåer av **IL-10**. De tre grisar som

uppvisade nivåer över 50 pg/mL var samtliga positiva avseende *L. intracellularis* PCR eller serologi. Detta cytokin anses nedreglera produktionen av andra s.k. pro-inflammatoriska cytokiner och har i studier avseende svindysenteri (17) visats öka under sjukdomens konvalescensperiod (dag 3 till dag 11 efter kliniskt tillfrisknande). IL-10 kunde inte påvisas hos gris "PHE 1", som befann sig i akut fas av svindysenteri. Det är intressant att den gris som uppvisade de högsta nivåerna av detta cytokin var den gris som drabbats av PHE och även var den enda gris som var positiv både avseende PCR och serologi.

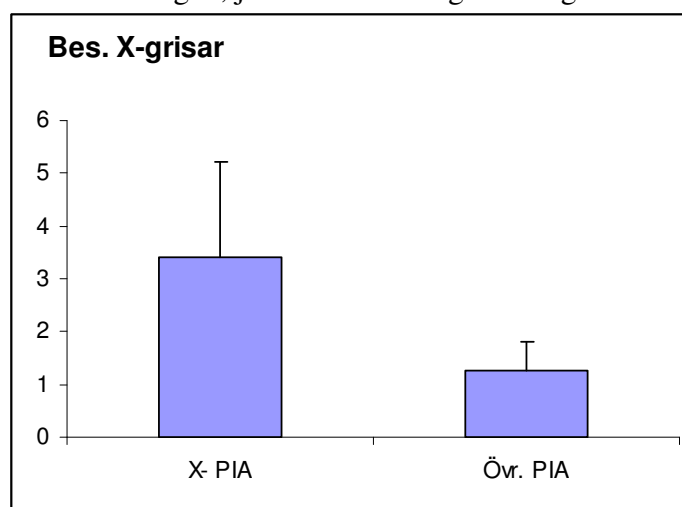
TNF- α aktiveras av olika substanser i bakteriernas cellvägg, t.ex. LPS (lipopolysackarider). Vid experimentella studier av svindysenteri sågs en ökning av TNF- α i samband med kliniska symptom och dessa värden var signifikant förhöjda under hela sjukdomsperioden, vilket stämmer väl med "PHE-gris 1". Detta skiljer sig från de övriga resultaten i vår studie, där ingen av grisarna uppvisade några förhöjda värden i samband med kliniska symptom (diarré), medan däremot tre kliniskt friska grisar uppvisade förhöjda värden. Två av dessa grisar var negativa avseende PCR och serologi medan en gris var PCR-positiv. Eftersom TNF- α var kraftigt förhöjt hos denna gris (218 pg/mL, att jämföras med de värden som sågs i studien över svindysenteri där medelvärdet var ~100 pg/mL med ett högsta värde på >300 pg/mL), kan detta indikera att djuret befann sig i ett tidigt skede av en grav infektion, alternativt att *L. intracellularis* inte aktiverar TNF- α och att denna gris även drabbats av en annan infektion. Inga tydliga makroskopiska förändringar sågs vid obduktionen. Intressant är, att "PHE-gris 3" inte uppvisade förhöjda nivåer vare sig lokalt i tarmen eller i serum. I den experimentella studien av svindysenteri uppvisade grisarna låga nivåer (~50 pg/mL) av TNF- α innan infektion, vilket indikerar en viss produktion av cytokinet även hos kliniskt friska individer. Liknande resultat har även setts vid studier av *Salmonella enterica* (19).

IFN- γ anses ha ett samband med intracellulära infektioner som t.ex. virusinfektioner. IFN- γ kunde dock inte påvisas i serum hos något av djuren. Detta överensstämmer med tidigare resultat vid studier av svindysenteri som är en extracellulär infektion, men det är oklart varför IFN- γ inte inducerades vid infektion med *L. intracellularis*. I studien av svindysenteri diskuterades att produktion av IFN- γ inte stimuleras vid lokala infektioner i tarmen (17).

Analys av cytokiner i tarmvävnad

Utifrån ovanstående resonemang, var det förvånande att en signifikant högre förekomst av IFN- γ kunde detekteras i tarmvävnad från PIA-grisarna. När dessa resultat analyserades ytterligare, framgick att skillnaden (se figur 2 nedan) härrörde från tre grisar inköpta från samma besättning, "besättning X". En av dessa tre grisar var positiv för *L. intracellularis* med PCR medan övriga två var negativa. De två kontrollgrisarna från denna besättning hade låga nivåer av IFN- γ , 0,53 resp. 0,75. Besättningen diagnostiserades en månad senare med PMWS, där infektion med porcint circovirus typ 2 spelar stor roll. PMWS och proliferativ enteropati har ofta likartad klinisk bild och kan inte särskiljas makroskopiskt vid obduktion. En av kontrollgrisarna hade epiteloïdcellsgranulom och en PIA-gris hade lymffollikelgranulom vid mikroskopisk undersökning, men inga för PMWS typiska inklusionskroppar. Resultaten är dock intressanta och fortsatta studier är önskvärda. "PHE-gris 1" som senare visade sig ha svindysenteri hade en nivå om 0,04 i tarmvävnad.

Figur 2. IFN- γ i vävnadsprov från tre "PIA-grisar" inköpta från besättning X, jämfört med övriga "PIA-grisar" i försöket.



Påvisande av cytokinerna IL-1 β och IL-6 verkar inte ha något samband med proliferativ enteropati. En enda gris, "PHE 1", visade kraftigt förhöjda nivåer (130 pg/mL respektive 268 pg/mL) av dessa båda cytokiner. Förhöjda nivåer av IL-1 β och IL-6 stämmer dock väl med det mönster som ses vid akut svindysenteri (17).

Publikationer och övrig resultatförmedling

En vetenskaplig artikel föreligger i manuskript (Jacobson, M., Andersson, M., Lindberg, R., Jensen-Waern, M. 2009. The cytokine response in pigs suffering from the acute or chronic form of proliferative enteropathy) och är avsedd för publicering i *Research in Veterinary Science*.

Resultaten kommer vidare att presenteras muntligen och i form av en poster vid VH-fakultetens årliga forskningsdag 2009.

Resultaten kommer också att förmedlas till veterinärer och vetenskapsmän i form av ett abstract och en muntlig presentation vid nästa IPVS-kongress (2010).

En artikel kommer att färdigställas och publiceras i "Svensk Veterinärtidning".

En kortfattad populärvetenskaplig artikel kommer att publiceras i Svenska djurhälsovårdens tidskrift "Svinhälsonytt" och/eller i "Svensk Gris med knorr".

Referenser

1. Jacobson M, Gerth Löfstedt M, Holmgren N, Lundeheim N & Fellström C. The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and in the wild boar population. *J Vet Med B* 2005, 52:7, 386-391.
2. McOrist S, Smith SH, Green LE. Estimate of direct financial losses due to porcine Proliferative enteropathy. *Vet. Rec.* 1997, 140, 579-581.
3. Jacobson M, Hård af Segerstad C, Gunnarsson A, Fellström C, de Verdier Klingenberg K, Wallgren P & Jensen-Waern M. Diarrhoea in the growing pig – a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Res Vet Sci*, 2003, 74, 163-169.
4. Jacobson M, Aspan A, Heldtander Königsson M, Hård af Segerstad C, Wallgren P, Fellström C, Jensen-Waern M, Gunnarsson A. Routine diagnostics of *Lawsonia*

- intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. *Vet Microb*, 2004, 102:3-4, 189-201.
5. Smith SH, McOrist S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res Vet Sci*, 1997, 62, 6-10.
 6. Winkelman NL. Proliferative enteritis –“ileitis”. Information and control. *Proc Am Assoc Swine Pract*, 1987, 225-234.
 7. Winkelman NL, Dee S. Ileitis: an update. *Comp Contin Educat Pract Vet*, 1996, S19 – S25.
 8. Holyoake PK, Cutler RS, Monckton RP. The epidemiology of field cases of proliferative enteritis. *Proc Aust Pig Sci Assoc*, 1991, 3, 115-122.
 9. Smith DGE, Lawson GHK. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet Microb*, 2001, 82, 331-345.
 10. Bane DP, Neumann E, Gebhart CJ, Gardner IA, Norby B. Porcine proliferative enteropathy: a case-control study in swine herds in the United States. *J Swine Health Prod*, 2001, 9:4, 155-158.
 11. Ohlinger VF, Pesch S, Knittel J. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in diagnostic samples from Germany, the Netherlands and Belgium. *Proc 16th IPVS Congr*, Melbourne, Australia, 2000, p. 71.
 12. Bane DP, Neumann E, Gebhart CJ, Gardner IA, Norby B. Porcine proliferative enteropathy: a case-control study in swine herds in the United States. *J Swine Health Prod*, 2001, 9:4, 155-158.
 13. Smith DGE, Mitchell SC, Nash T, Rhind S. Gamma interferon influences intestinal epithelial hyperplasia caused by *Lawsonia intracellularis* infection in mice. *Infect Immun*, 2000, 68:12, 6737-6743.
 14. McOrist S, MacIntyre N, Stokes CR, Lawson GHK. Immunocytological responses in porcine enteropathies. *Infect Immun*, 1992, 60:10, 4184-4191.
 15. Connor J, Winkelman N, Gebhart C, Deen J, Wolff T. Inclusion of BMD[®] or BMD[®] plus 3-Nitro[®] in swine diets during ileitis vaccination. *Proc 18th IPVS Congr*, Hamburg, Germany, 2004, 1, p. 275.
 16. Meyns T, Timmerman T, von Freyburg M, Cluydts G, Thoonen H, Maes D, de Kruif A. Safety of Enterisol[®] ileitis in pre-breeding gilts in Belgium. *Proc 18th IPVS Congr*, Hamburg, Germany, 2004, 1, p. 426.
 17. Kruse, R, Essén-Gustavsson, B, Fossum, C, Jensen-Waern, M. Blood concentrations of the cytokines IL-1beta, IL-6, IL-10, TNF-alpha and IFN-gamma during experimentally induced swine dysentery. *Acta Vet Scand*, 2008, 50:32, 1-12.
 18. Jacobson, M, Wallgren, P, Merza, M, Emanuelsson, U. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of antibodies to *Lawsonia intracellularis* in pig sera. *Vet Res*, 2008, *In manuscript*.
 19. Fraser, JN, Davis BL, Skjolaas, KA, Burkey, TE, Dritz, SS, Johnson, BJ, Minton, JE. Effects of feeding *Salmonella enterica* serovar Typhimurium or serovar Cholerasuis on growth performance and circulating insulin-like growth factor-I, tumor necrosis factor-(alpha) and interleukin-1 (beta) in weaned pigs. *J Anim Sci*, 2007, 85:5, 1161-1167.
 20. Thomson JR, Smith WJ, Fowler VR, Edwards SA, Hazzledine M. Non-specific colitis in pigs: Defining the condition. *Proc 17th IPVS Congr*, Ames, Iowa, USA, 2002, p. 213.
 21. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25, 402-408.