

Slutrapport projektnummer V0650129

LAWSONIA INTRACELLULARIS HOS GRIS –UTGÖR LIVDJUR EN RISK AVSEENDE SMITTSPRIDNING OCH KAN BLODPROV ANVÄNDAS FÖR ATT SPÅRA SMITTADE BESÄTTNINGAR?

Syfte

- Att med hjälp av PCR-analys av träckprov undersöka när under uppfödningen den huvudsakliga smittspridningen av bakterien *Lawsonia intracellularis* sker i en sektionerad besättning med all in-all out och noggranna skötsel- och hygienrutiner.
- Att med PCR bestämma infektionsstatus hos de gyltor som lämnar besättningen.
- Att utvärdera en ny metod (ELISA) för bestämning av antikroppar i blod genom att analysera blodprov och träckprov insamlade från samma djur vid upprepade tillfällen. På så sätt kan utsöndringen av bakterien i avföring relateras till serokonverteringen hos de individuella djuren.

Avsaknad av pålitlig diagnostik har gjort att endast ett fåtal studier finns över bakteriens smittspridning inom eller mellan besättningar. Kunskap om smittspridningen i livdjursproducerande besättningar är nödvändig för att utforma strategier för att minska andelen djur som aktivt urskiljer smittämnet i samband med försäljning.

Bakgrund

Proliferativ enteropati är en av de viktigaste orsakerna till tarmstörningar och dålig tillväxt hos växande grisar. Sjukdomen orsakas av bakterien *Lawsonia intracellularis* och är påvisad i 48 % av svenska smågrisproducerande besättningar (1). Den medför ett avsevärt lidande för djuren och stora ekonomiska förluster för producenten. Djur som drabbats av denna infektion är i genomsnitt tre veckor äldre än friska grisar (86 respektive 65 dagar) vid förmedling (2). Smittspridningen inom en besättning påverkas av olika faktorer som till exempel grad av sektionering, rengöring, desinfektion och ”tomtid” mellan omgångar (3). För att kunna gå in med riktade åtgärder för att reducera spridningen av bakterien är det viktigt att fastställa tidpunkt för den huvudsakliga smittspridningen i enskilda besättningar. Vidare är det viktigt att ha tillgång till pålitliga diagnostiska metoder för screening av besättningar avseende förekomst av bakterien. Tidigare studier har visat att specifika antikroppar (IgG) kan påvisas i blodet cirka 3 veckor efter att djuret infekterats (4). Dessa kvarstår enligt olika studier i fem till fjorton veckor (5). Eftersom bakterien enbart kan odlas på cellkultur vid en handfull laboratorier i världen sker diagnostik istället via obduktion och specifik PCR (6). Sedan några år finns även en kommersiell serologi tillgänglig. Metoden baseras på att specifika antikroppar binds till färdigpreparerade bakterier på ett objektsglas, så kallad IFAT (IleiTest, Elanco Animal Health, Indianapolis, Indiana, USA). Avläsningen sker med speciella fluorescensmikroskop och kan därför endast utföras på de laboratorier som har tillgång till sådana (5). Metoden har evaluerats i flera studier och bedömts ge bra resultat, dock kan överensstämmelsen mellan olika laboratorier variera, metoden är inte helt standardiserad och tekniken bygger till viss del på en subjektiv bedömning, varför den fodrar en viss erfarenhet

hos bedömaren (7). Dessutom är tillgången till färdigpreparerade glas varierande. Förutom denna IFAT har olika tekniker baserade på ELISA beskrivits (8), men ingen av dessa har tidigare funnits kommersiellt tillgänglig. En ny s.k. blocking ELISA har nyligen introducerats i Europa och är nu på väg att lanseras även i Sverige. En tysk rapport anser att denna teknik ger färre tveksamma resultat jämfört med IFAT-tekniken (10). Avläsning sker med en spektrofotometer och kan därför standardiseras. Erfarenheter från tidigare arbeten med denna teknik visar att etableringen av ett så kallat ”cut off”-värde, det vill säga den punkt på kurvan som skiljer positiva resultat från negativa, kan variera mellan regioner och länder och det är därför viktigt att metoden utprovas enligt svenska förhållanden.

En mängd rapporter finns publicerade, som beskriver svårigheten att påvisa *L. intracellularis* vid upprepad provtagning (4). Detta avfärdas vanligen med antagandet att bakterien utsöndras med oregelbundna intervall, men detta påstående saknar säker grund. Vi har tidigare visat att avföringsprov kan innehålla substanser som hämmar PCR (6). Förekomsten av dessa substanser varierar mellan olika prov och en ökad mängd hämmande substanser resulterar i falskt negativa provsvar. Eftersom endast några laboratorier i världen (varav SVA är ett) kan påvisa detta, kan en varierande förekomst av hämmande substanser vara en alternativ förklaring till skillnaderna i resultat.

På grund av de diagnostiska svårigheterna finns endast ett fåtal studier publicerade som beskriver bakteriens smittspridning inom eller mellan besättningar (10). Av speciellt intresse är att beskriva smittspridningens dynamik i besättningar som säljer livdjur, eftersom detta kan påverka strategier för framtida vaccinering och eventuell medicinering för att minska andelen djur som aktivt urskiljer smittämnet i samband med försäljning.

Material

Etiskt tillstånd finns från Uppsala Djurförsöksetiska nämnd (Diarienummer C 111/7).

I försöket ingående material fördelades på två separata studier, 1 och 2:

Studie 1. Utvärdering av en ny ELISA.

Besättningar

Totalt inkluderades 182 grisar från 25 besättningar. Sera från dessa besättningar hade insamlats i anslutning till två tidigare försök, A (2) och B (11), och förvarades vid -80°C. I försök A, hade besättningarna selekterats utifrån genomsnittlig tillväxt och kliniska problem (”bra” besättningar utan hälsoproblem jämfördes med ”dåliga” besättningar med problem). I försök B, hade besättningarna selekterats utifrån en anamnes om problem med diarré hos tillväxtgrisarna. I en av besättningarna samlades prov in före och efter genomförd sanering av tillväxtavdelningarna och i en besättning hade en sanering mot svindysenteri genomförts med lyckat resultat men besättningen hade nyligen haft utbrott av akut hemorragisk diarré. Ingen av besättningarna hade någon pågående fodermedicinering.

Djur

Grisarna var 7-12 veckor gamla och hade inte behandlats med antibiotika de senaste två veckorna. I försök A ingick 54 grisar från besättningar med dålig tillväxt samt 12 grisar från besättningar med god tillväxt. I försök B ingick 10 grisar per besättning, totalt 120 grisar (från en besättning insamlades sera endast från 6 djur).

Försöksdesign.

I försök A transporterades grisarna till laboratorium där de omedelbart avlivades och obducerades. Individuella prov analyserades avseende förekomst av bakterierna *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira* spp, *Campylobacter* spp, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Yersinia* spp, parasiter och rotavirus (2). I försök B insamlades

individuella faeces- och blodprov i besättningarna för analys avseende förekomst av *L. intracellularis* DNA (11) och antikroppar. Sera frystes vid -80°C i avvaktan på analys.

Studie 2. Utsöndring av Lawsonia intracellularis bland gyltor i olika åldrar i en gyltproducerande besättning.

Besättningar

Studien genomfördes i en konventionell gyltproducerande besättning vars hälsoläge monitorerats av universitetets veterinärer sedan 20 år tillbaka. *Lawsonia intracellularis* hade tidigare påvisats i tillväxtstallarna medan status i lösdriifterna var okänd. Besättningen säljer 10-15 % av gyltorna som gyltämnen, 10-15 % som unga gyltor (~22 veckors ålder), 10-15 % som betäckningsfärdiga gyltor och 55-70 % som dräktiga. De 118 sinsuggorna hölls i kall lösdrift på djupströbädd och flyttades 1-2 dagar före beräknad grisning till tvättade och desinfekterade grisningsboxar. Grupper om 18 suggor grisade med 4 veckors intervall och en veckas beräknad tomtid. Smågrisarna avvandes vid 5 veckors ålder och stannade i grisningsboxen i ytterligare en vecka varefter de flyttades till tillväxtavdelningar belägna i en separat byggnad. Kullarna blandades inte. Tillväxtavdelningarna tvättades, desinfekterades och stod tomma i 1-7 dagar mellan omgångarna. Efter 4-6 veckor flyttades gyltorna till en kall lösdrift med djupströbädd. Här flyttades och storlekssorterades de vid 3-4 tillfällen.

Utifrån preliminära resultat utökades studien till att även omfatta en mottagar-besättning. Varannan månad köptes 6 unga gyltor och 6 betäckningsfärdiga gyltor in från den gyltproducerande besättningen. De hölls i karantän belägen 1 km ifrån besättningen. Separat utrustning och separata skyddskläder användes i karantänen. Gyltorna stannade här till betäckning, då de flyttades in i besättningen (3-9 veckor efter ankomst). Denna bestod av 160 suggor. Grisningsboxarna tvättades och desinfekterades mellan omgångarna. Efter avvänjning vid 5 veckors ålder stannade smågrisarna i grisningsboxarna 1-2 veckor innan de flyttades, blandades och storlekssorterades i tillväxtavdelningarna. De såldes vid 75 dagars ålder (~30 kg). Dödligheten bland tillväxtgrisar var 0.4 till 1.5% och genomsnittlig tillväxt var 500 g/dag. *L. intracellularis* har aldrig påvisats i besättningen (2).

Djur

I den gyltproducerande besättningen ingick 50 örönmärkta gyltor (Yorkshire × Svensk Lantras), 1-3grisar/kull, vilka var födda inom en vecka och i samma grisningsavdelning. I mottagarbesättningen ingick samtliga gyltor som inköptes under ett år, totalt 60 djur, i åldern 22-35 veckor. För att konfirmera besättningens infektionsstatus provtogs även 100 tillväxtgrisar i åldern 10-12 veckor.

Försöksdesign

I den gyltproducerande besättningen provtogs grisarna var tredje vecka, från och med sista dagen i grisningsboxen (en vecka efter avvänjning) fram till försäljning. I mottagarbesättningen provtogs gyltorna vid ankomst, efter 3 veckor och i ett fall även efter 6 veckor i karantän, och innan de flyttades in i besättningen. Där provtogs 20 tillväxtgrisar vid 5 tillfällen fördelade över 1 ½ års tid. Med ett undantag, då bara faecesprov togs från gyltorna i karantän, insamlades individuella faeces- och blodprov från varje djur vid varje tillfälle.

Metoder

Analyser

Faecesproven förvarades vid -80°C tills provtagningarna avslutats i respektive besättning. Därefter analyserades de med så kallad nestad PCR i enlighet med tidigare protokoll (6). En positiv kontroll och negativa kontroller med en intern kontroll (mimic) inkluderades i varje

körning. Inhiberade prov re-analyserades en eller två gånger, och om inga resultat erhöles, preparerades proven istället med ett kommersiellt kit varefter de analyserades med konventionell PCR (6).

Blodprov togs i rör utan tillsats. Efter centrifugering förvarades sera vid -20°C eller -80°C fram till analys med blocking ELISA (Svanova Biotech, Uppsala, Sweden, eller Bioscreen GmbH, Münster, Germany). I korthet inkuberades sera med cellodlade antigen i en timme vid 37°C , varefter de tvättades tre gånger och inkuberades med horseradish peroxidase-konjugerat anti-*Lawsonia intracellularis* monoklonala antikroppar i en timme vid 37°C . Efter tvättning tillsattes substrat, inkuberades i 10 minuter innan en stopplösning tillsattes varefter OD-värdet avlästes vid 450 nm. Absorbansvärdet omräknades till kalkylerad procent inhibition (PI).

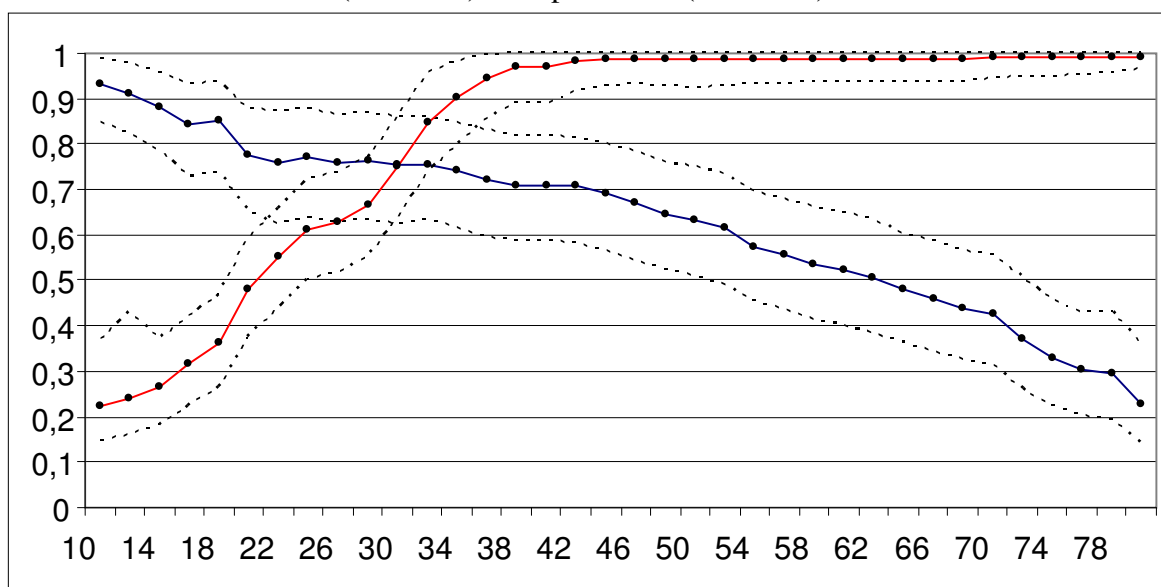
ELISAn evaluerades med en ny statistisk metod, så kallad Gibbs sampler (12). Denna metod förutsätter inte att en analysmetod är mer korrekt än den andra. Metoden kräver att prov från minst två sub-grupper analyseras med två olika metoder, i detta fall ELISA och en tidigare använd metod, IFAT (Elanco Animal Health Indianapolis, Indiana, USA), som anges ha en specificitet om 97 % och en sensitivitet om 91 %.

Resultat

Studie 1. Utvärdering av en ny ELISA.

Preliminära resultat indikerade att rekommenderat cut-off-värde (PI 30) eventuellt behövde justeras. Tre olika cut-off värden beräknades; 25, 30 och 35. Vid 95 % konfidensintervall och ett cut-off på PI 25 erhöles en sensitivitet på 76 % och en specificitet på 62 %; vid ett cut-off på PI 30 erhöles en sensitivitet på 75 % och en specificitet på 75 %; och vid ett cut-off på PI 35 erhöles en sensitivitet på 72 % och en specificitet på 93 %, varför ett cut-off-värde på PI 35 valdes för fortsatta analyser. Resultaten illustreras i Figur 1.

Fig 1. Sambandet mellan sensitivitet och specificitet vid analys av antikroppar mot *L. intracellularis* med blocking ELISA. Den horisontella axeln indikerar olika cut-off nivåer. Kurvorna visar sensitivitet (blå kurva) och specificitet (röd kurva) vid olika cut-off-värden.



När den tidigare använda IFAT analyserades med Gibbs sampler, erhöles en sensitivitet på 88 % och en specificitet på 95 %.

Studie 2. Utsöndring av Lawsonia intracellularis bland gyltor i olika åldrar från en gyltproducerande besättning.

Totalt analyserades 492 faecesprov och 472 sera från den gyltproducerande besättningen (Tabell 1) och 256 faecesprov och 244 sera från mottagarbesättningen. I den gyltproducerande besättningen såldes sex av de 50 grisarna som gyltämnen (88-94 dagar gamla), tre grisar såldes som unga gyltor (24 veckors ålder), och 23 djur såldes dräktiga. Tre grisar avlivades vid 40 veckors ålder på grund av dålig tillväxt. Ytterligare 7 djur försvann ur studien av andra orsaker (dödsfall eller avlivning). Studien avslutades efter 8 månader (totalt 14 provtagningar) då endast 8 djur fanns kvar i besättningen.

L. intracellularis kunde inte påvisas när gyltorna fortfarande var kvar i grisningsboxarna. Vid provtagningen i tillväxtavdelningen tre veckor senare var 30 djur PCR-positiva och vid den tredje provtagningen, när de flyttats till lösdriften, var 32 grisar positiva. Därefter minskade antalet positiva djur successivt. Vid de tre sista provtagningarna kunde inga positiva djur påvisas (Tabell 1).

Tabell 1. resultaten från analys av 492 faecesprov med nestad PCR och 472 sera analyserade med blocking ELISA. Proven insamlades från 50 rekryteringsgyltor från och med den sista dagen i grisningsboxen en vecka efter avvänjning, och därefter var tredje vecka fram till försäljning.

Ålder	Antal provtagna grisar	PCR-pos.	PCR-pos, %	Sero-pos.	Sero-pos, %
6 veckor	50	0	0	0	0
9 veckor	50	30	60	2	4 %
12 veckor	47	32	68	37	84 %
15 veckor	40	9	23	36	95 %
18 veckor	39	2	5	27	73 %
21 veckor	38	2	5	23	64 %
24 veckor	33	7	21	12	38 %
27 veckor	33	0	0	12	38 %
30 veckor	32	0	0	12	39 %
33 veckor	32	0	0	22	71 %
36 veckor	32	1	3	18	58 %
39 veckor	33	0	0	21	66 %
42 veckor	25	0	0	16	67 %
45 veckor	8	0	0	3	43 %

Totalt 49 av de 50 gyltorna utsöndrade *L. intracellularis* vid minst ett tillfälle. Av dessa var 25 st positiva vid en enda provtagning, 12 var positiva vid två efterföljande provtagningar, 2 grisar var positiva vid tre efterföljande provtagningar och en gris var positiv vid fyra på varandra följande provtagningstillfällen. Nio grisar utsöndrade bakterien intermittent (Tabell 2). 29 % av proven var inhiberade vid första analystillfället och re-analyserades.

Tabell 2. Olika mönster för urskiljning av *Lawsonia intracellularis* i faeces från 50 djur avvanda vid 5 veckors ålder. Grisarna provtogs sista dagen i grisningsboxen och därefter var tredje vecka fram till försäljning. I tabellen kan utläsas antal djur som uppvisat de olika mönstren. “+” indikerar att positiva prov erhöles.

	Ålder (veckor)													
	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45
Antal grisar														
11		+												
13			+											
1						+								
8		+	+											
3			+	+										
1		+	+	+										
1			+	+	+									
1		+	+	+	+									
1		+		+										
2		+	+	+						+				
1		+				+								
2		+	+							+				
3		+								+				
1		+	+								+			
1														

I mottagarbesättningen insamlades prov från sammanlagt 60 gyltor och 100 tillväxtgrisar vid 21 provtagningstillfällen. Samtliga tillväxtgrisar och tre gyltgrupper var negativa avseende *L. intracellularis* i faeces. I de två sista grupperna var en gylta i vardera gruppen (27 resp. 32 v. gamla), PCR-positiva vid ankomsten. Båda dessa gyltor var negativa vid de två efterföljande provtagningarna. Däremot var tre andra gyltor i dessa två grupper positiva vid nästa provtagning. Två av dessa stod i karantänen i 6 veckor och provtogs ytterligare en gång innan de flyttades in i besättningen. Vid dessa provtagningar var de negativa. Den tredje gyltan stod i karantän i 3 veckor och var PCR-positiv dagen innan hon flyttades in i besättningen. Grisar från hennes första kull provtogs vid 12 veckors ålder tillsammans med andra grisar som de blandats med i tillväxtavdelningen (totalt 20 grisar). Samtliga prov var negativa. 16 % av proven var inhiberade vid första analystillfället och re-analyserades.

Serologi

Från samtliga grisar i studie 2 insamlades även blodprov. Resultaten från den gyltproducerande besättningen ses i Tabell 1.

Totalt 52 % av djuren serokonverterade 3 veckor efter att bakterien påvisats i faeces. Vidare hade 37 % av djuren serokonverterat samtidigt som bakterien för första gången påvisades i avföring. Fyra grisar (8 %) var seronegativa trots att bakterien påvisats i faeces 3 veckor tidigare och i ett fall kunde bakterien påvisas vid 3 på varandra följande tillfällen, men denna gris serokonverterade aldrig. Däremot sågs inte det omvända mönstret utan samtliga grisar som serokonverterade utsöndrade även bakterien i avföring vid minst ett provtagningstillfälle. Liknande mönster sågs under hela provtagningsperioden och generellt serokonverterade djuren 0-6 veckor efter att bakterien påvisats i faeces. En gris var PCR-negativ under hela perioden (13 provtagningar) och med undantag för provtagningen vid 33 veckors ålder, då ett svagt antikroppsvar (PI 46) kunde ses, var denna gris även seronegativ under hela uppfödningen. En annan gris utsöndrade bakterien vid två provtagningstillfällen och hade påvisbara antikroppar i sera under 10 på varandra följande provtagningar (30 veckor). Fem

grisar utsöndrade bakterien i faeces och serokonverterade i samband med detta, därefter låg antikropps nivåerna under cut-off i 3-9 veckor, varefter bakterien kunde påvisas i avföring igen.

I mottagarbesättningen var samtliga tillväxtgrisar seronegativa vid samtliga provtagningstillfällen. Samtliga gyltor var seropositiva och 58 av 60 gyltor hade PI över 35 vid samtliga provtagningstillfällen. Två gyltor hade vid första provtagningen i karantän PI på 32 respektive 34, och dessa värden steg sedan vid efterföljande provtagningar till PI 85 respektive 88.

Diskussion

Studie 1. Utvärdering av en ny ELISA.

Tidigare metodvalideringar baseras på användandet av en så kallad "gold standard" som är en väl etablerad metod. I statistisk-teoretiska modeller betraktas denna "gold standard" som 100 % sann. Vid utvärdering av nya metoder jämförs dessa mot "gold standard", dvs. en ny metod kan till exempel identifiera 99 % av de prov som enligt den gamla metoden är positiva. Problemet med denna beräkningsmodell är, att om "gold standard" i verkligheten har en dålig sensitivitet/specifitet kommer den nya metoden att visa sämre resultat, än vad den egentligen presterar. Dessutom kan den nya metoden enligt detta beräkningsätt aldrig bli bättre än den gamla. "Gibbs sampler" är ett sätt att hantera denna problematik, där man använder sig av en fiktiv "gold standard" mot vilken både den gamla och den nya metoden jämförs (12). Enligt det gamla beräkningsättet hade den etablerade metoden, IFAT, en specificitet om 97 % och en sensitivitet om 91 %. Studier där "gold standard" utgörs av påvisande av bakterien i tarmvävnad med immunofluorescens och/eller PCR, anger istället metodens sensitivitet till 73 % (13). Enligt "Gibbs sampler" är metodens verkliga specificitet 95 % och sensitivitet 88 % vid 95 % konfidensintervall. Ett stort problem med IFAT är dock att den avläses manuellt, vilket dels är mycket tidskrävande och dels ger upphov till subjektiva bedömningar (7). Vidare har tillgängligheten under senare år kraftigt försämrats och metoden är inte längre säkert kommersiellt tillgänglig.

Den nya blocking ELISAn anges enligt tillverkaren ha en sensitivitet om 96,5 % och en specificitet om 98,7 %, när IFAT används som "gold standard". Detta stämmer inte överens med resultaten vid analys med "Gibbs sampler", som vid ett cut-off på PI 35 visar en sensitivitet på 72 % med en specificitet på 93 %. Orsaken till skillnaderna är oklar men kan bero på skillnader i de prov som använts vid evalueringarna. När en ny metod skall utvärderas används vanligen prov som är säkert negativa, ofta sera från unga SPF- eller gnotobiotiska djur, vilka jämförs med prov som är säkert positiva, ofta sera från djur från olika experimentella infektionsförsök där bakterien påvisats i faeces tre veckor tidigare (14). Ett generellt problem vid användande av serologi är förekomst av ospecifika bindningar och korsreaktioner. Dessa ger upphov till "bakgrundsfärgning" och är anledningen till att man vid ELISA använder sig av s.k. cut-off-värden. Det är känt, att "bakgrundsfärgningen" varierar mellan olika grupper av djur (djur i experimentell miljö kontra djur från fältniljöer) liksom mellan djur av olika åldrar (15). Av detta skäl skiljer sig resultaten från fältförsök ofta från de som härrör från en experimentell situation. Eftersom proven som användes i vår studie kom från ett fältmaterial, kan detta mycket väl förklara ovanstående skillnader. Vidare visar resultaten från delstudie 2, att det inte finns något absolut samband mellan infektion med *L. intracellularis* och utvecklandet av antikroppar. Detta innebär, att en felkälla föreligger i beräkningar som baseras på antagandet att en gris som urskiljer bakterien i faeces (PCR-positiv) alltid kommer att ha utvecklat antikroppar mot denna bakterie 3 veckor senare. I själva verket hade endast 52 % av grisarna i delstudie 2 påvisbara antikroppar efter 3 veckor. Ytterligare 37 % hade antikroppar samtidigt som bakterien påvisades för första gången, vilket

vi tolkar som att dessa djur infekterats och/eller utsöndrat bakterien någon gång under de mellanliggande 3 veckorna. Detta fenomen har även observerats av andra författare, vilka föreslår att utvecklingen av antikroppar i första hand är relaterat till graden av skador i tarmen (16).

Studie 2. Utsöndring av Lawsonia intracellularis bland gyltor i olika åldrar från en gyltproducerande besättning.

Det står klart att den största smittspridningen skedde i tillväxtavdelningarna och under de första tre veckorna i lösdriften. Därefter avklingade bakterieutsöndringen successivt. En viss individuell variation sågs och vissa djur utsöndrade endast bakterien vid ett tillfälle medan några utsöndrade den vid fyra tillfällen, och en gris utsöndrade bakterien två gånger med 21 veckors mellanrum. En enda gris var PCR-negativ under hela perioden. De 6 grisar som såldes vid 13 veckors ålder var samtliga PCR-positiva vid provtagningen en vecka tidigare. Vi har tidigare visat, att *L. intracellularis* förekommer i 48 % av de svenska smågrisbesättningarna vilket antyder, att det finns besättningar som idag är fria från smittämnet. Med tanke på den stora betydelse bakterien har för den smågrisproducerande besättningens ekonomi, vore det önskvärt om dessa besättningar undvek att köpa in aktivt smittförande djur. En möjlig väg för att minska denna risk är att etablera profiler avseende *L. intracellularis* i livdjursförsäljande besättningar. Besättningar i vilka smittan redan förekommer kan även fortsättningsvis köpa t.ex. gyltämnen, medan besättningar som i likhet med mottagarbesättningen i vår studie inte är infekterade, bör rekommenderas att i första hand köpa dräktiga gyltor. Alternativt kan djur i "riskzonen" hållas i karantän under en längre period, dock visar vår studie på riskerna med ett sådant förfaringsätt. Ett tredje alternativ är att successivt sanera bort bakterien från infekterade, livdjursförsäljande besättningar. Generellt är det svårt att utrota bakterier som har stor spridning inom en population och risken att återinfekteras är stor, men exempel från Danmark visar att det är möjligt.

Denna studie visar, att tidpunkten från det att bakterien kan påvisas i faeces till dess att antikroppar kan påvisas i blod varierar och vissa djur utvecklar över huvud taget inga påvisbara cirkulerande antikroppar. Detekterbara nivåer av antikroppar kvarstår i 3-30 veckor. Detta innebär, att studier som enbart baseras på förekomst av antikroppar i blodet i ett begränsat antal prov kan ge missvisande resultat. Vidare visar resultaten från delstudie 1, att ett visst antal prov kommer att vara falskt positiva eller falskt negativa, vilket också måste beaktas. Serologiska metoder, ffa ELISA, har dock fördelen att de är billiga och kan appliceras på ett stort antal prov, vilket gör dem användbara vid större screenings där andelen falskt positiva/negativa med stor sannolikhet kan beräknas. En förutsättning är dock, att metodens sensitivitet och specificitet är väl kända.

Det är oklart, varför inte alla djur serokonverterade. En hypotes är, att bakterien utvecklat metoder att "gömma sig" undan kroppens immunförsvar (17). Andra teorier är, att kroppens systemiska immunförsvar generellt inte aktiveras vid en begränsad infektion i tarmen (16). Förekomst av cirkulerande antikroppar i blod skulle i så fall vara ett resultat av en mer djupgående eller utbredd skada där bakterien kommit i kontakt med immunceller i vävnad eller blod. Detta skulle i så fall betyda att serologi förmodligen inte är en tillförlitlig metod när det gäller att påvisa symptomlösa smittbärare. Samma resultat har setts i studier beträffande vaccinering och man antar, att det i första hand är det lokala immunsystemet som har betydelse vid infektion med *L. intracellularis*. Vidare visar resultaten i vår studie, att de cirkulerande antikropparna inte ger upphov till någon skyddande immunitet, eftersom flera grisar fortfarande bar på bakterien flera veckor efter det att antikroppar påvisats i blodet.

Slutsatser

- I denna sektionerade besättning med all in-all out och noggranna skötsel- och hygienrutiner sker den huvudsakliga smittspridningen i tillväxtavdelningarna och de första tre veckorna i lösdriften.
- Gyltämnen som lämnade besättningen var med stor sannolikhet smittbärande, medan dräktiga gyltor sannolikt inte var infekterade.
- Vid ett cut-off-värde på PI 35, hade blocking ELISA en sensitivitet på 72 % och en specificitet på 93 %. Detekterbara antikroppar kvarstod i 3-30 veckor. Något strikt tidsintervall föreligger inte mellan infektion med *L. intracellularis* och påvisande av antikroppar i blodet.

Vetenskapliga publikationer

Studien kommer att resultera i två artiklar avsedda för publicering i en internationell vetenskapligt granskad tidskrift, "Veterinary Research". Dessa artiklar befinner sig för närvarande i manuskript:

- 1). Jacobson M, Wallgren P, Merza M, Emanuelsson U. 2009. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of antibodies to *Lawsonia intracellularis* in pig sera.
- 2). Jacobson M, Lindberg M, Wallgren P. 2009. Shedding of *Lawsonia intracellularis* in replacement gilts at different ages.

Övrig resultatförmedling till näringen

Resultaten från delstudie 2 har presenterats vid "The 20th International Pig Veterinary Society Congress" 2008 i form av ett abstract och en oral presentation med titeln "Shedding of *Lawsonia intracellularis* in a breeding herd selling replacement gilts at different ages". En sammanfattande artikel är tänkt för publicering i "Svensk veterinärtidning" och en populärvetenskaplig artikel kommer att tillställas i tidningen "Svensk gris med knorr". Kontakter har tagits för att presentera resultaten vid Svenska Djurhälsovårdens årliga konferens, men detta har hittills inte varit möjligt att ordna.

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. 52:7, 386-391.
2. 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.
3. Löfstedt M, Holmgren N, Lundeheim N, Jacobson M, Fellström C. Risk factors for diarrhoea in growers in Swedish pig herds. Proc. 18 th Int. Pig Vet. Soc. Congr. 2004, p. 288.
4. Knittel JP, Jordan DM, Schwartz KJ, Janke BH, Roof MB, McOrist S, Harris DL. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs. Am J Vet Res, 1998, 59:6, 722-726.
5. Just SD, Thoen CO, Thacker BJ, Thompson JU. Monitoring of *Lawsonia intracellularis* by indirect serum immunofluorescence assay in a commercial swine production system. J Swine Health Prod, 2001, 9:2, 57-61.

6. 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.
7. Mortimer I, Van der Heijden HMJF, Henderson LE, Thomson JR, Lawrence K. Proficiency testing among european laboratories using an immuno-fluorescent antibody test (IFAT) for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis* in pigs. *Proc. 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr.* 2000, p. 77.
8. Boesen HT, Jensen TK, Möller K, Jungersen G. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a serologic test for *Lawsonia intracellularis* the agent of porcine proliferative enteropathy. *Proc. 18 th Int. Pig Vet. Soc. Congr.* 2004, p. 251.
9. Keller C, Ohlinger VF, Wilms-Schulze Kump A, Grätz T, Grunert H, Sieverding E, Heggemann R, Hoßfeld P. Herd profiles of antibodies against *Lawsonia intracellularis* in German farms using a new blocking ELISA. *Proc. 18 th Int. Pig Vet. Soc. Congr.* 2004, p. 253.
10. Bronsvoort M, Norby B, Bane DP & Gardner IA. Management factors associated with seropositivity to *Lawsonia intracellularis* in US swine herds. *J Swine Health Prod*, 2001, 9, 285-290.
11. Jacobson M, Wennerbo S, Aspan A, Gunnarsson A, Fellström C. The importance of faecal sampling techniques in the PCR diagnosis of *Lawsonia intracellularis*. Abstract, *Proc. 19th IPVS Congress*, Copenhagen, Denmark, 2006, p. 11-17.
12. Frössling J, Bonnett, B, Lindberg A, Björkman C. Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without gold standard. *Prev Vet Med*, 2003, 141-153.
13. Jensen TK, Vigre H, Sörensen V, Möller K. Naturally acquired *Lawsonia intracellularis* infection in pigs studied from weaning to slaughter by indirect antibody immunofluorescence test and polymerase chain reaction on faeces. *Res Vet Sci*, 2005, 79, 93-98.
14. Guedes R, Gebhart C, Deen J, Winkelmann N. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *J Vet Diagn Invest*, 2002, 14, 528-530.
15. Jacobson M, Bornstein S, Wallgren P. The efficacy of simplified eradication strategies against sarcoptic mange mite infections in swine herds monitored by an ELISA. *Vet Par*, 1999, 81, 249-258.
16. Armbruster G, Deen J, Gebhart C, Pelger G, Keffaber K, Parks C. Review of *Lawsonia intracellularis* seroprevalence screening in the United States, June 2003 to July 2006. *38th Ann Meet AASV*, 2007, 231-233.
17. Jacobson M, Andersson M, Lindberg R, Jensen-Waern M. The cytokine response in pigs suffering from the acute or chronic form of proliferative enteropathy. *Res Vet Sci*, 2009, *In manuscript*.