

DIAGNOSTISKE UNDERSØGELSER AF FRAVÆNNINGSDIARRÉ MED FOKUS PÅ *E. COLI*

Poul Bækbo og Svend Haugegaard

SEGES Svineproduktion, Den rullende Afprøvning

STØTTET AF

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

Når grise med fravænningsdiarré forårsaget af *E. coli* skal behandles med antibiotika, anbefales det at foretage hyppige resistensbestemmelser. Valget af antibiotika bør baseres på mere end én prøve, der resistensbestemmes ved hver undersøgelse.

Sammendrag

Ved valg af antibiotika til behandling af fravænningsdiarré forårsaget af bakterien *E. coli* er det vigtigt at udvælge det rigtige antibiotika, som dræber bakterien.

I en enkelt besætning blev der konstateret, at resistensen (antibiotikafølsomheden) overfor enkelte antibiotika i de isolerede *E. coli* ændrede sig markant over en periode på tre måneder. Dette viste sig ved en stigning fra 0 % til 80 % i resistensen overfor ét antibiotikum og et fald fra ca. 70 % til 20 % i resistensen (en stigende følsomhed) overfor et andet antibiotikum. Stigningen og faldet kunne relateres til henholdsvis ibrugtagen og udfasning af de pågældende antibiotika i besætningen. Resistensforholdene hos *E. coli* ser derfor ud til at kunne ændres relativt hurtigt inden for en besætning, i dette tilfælde over få måneder.

På baggrund af undersøgelsen anbefales det derfor at foretage resistensbestemmelser ofte og at basere konklusionen på mere end én prøve. Endvidere fandtes, at resistensmønsteret baseret på flere prøver udtaget samme dag kunne variere mellem de forskellige prøver, og at resistensmønsteret fra *E. coli*-isolater fra sokkeprøver og fra obducerede grise ikke altid stemte overens. Forklaringen på disse varierende fund fra prøver udtaget samme dag samt på forskelligt materiale er givetvis, at undersøgelserne afspejler, at de reelt er foretaget på forskellige stammer/typer af *E. coli*-bakterier, som alle er til stede i besætningen.

I løbet af undersøgelsesperioden på ca. tre måneder var forekomsten af sygdomsfund ved obduktion af døde grise og ved de bakteriologiske undersøgelser konstant. Disse sygdomsfund omfattede mange grise med klassisk fravænningsdiarré, og hovedparten af prøverne indeholdt hæmolytiske *E. coli*, ofte i massiv mængde og med et relativt overensstemmende udtryk af virulensfaktorer (F18 og LT-toksin).

Undersøgelsen er udført i én smågrisebesætning, hvor der over små tre måneder løbende blev udtaget et stort antal sokkeprøver og obduceret et tilsvarende stort antal grise med fravænningsdiarré. Bedriften havde 1.200 årssøer med en årsproduktion af 30-kgs grise på ca. 40.000, som var baseret på otte smågrisesektioner á 22 stier, der kørte efter alt-ind-alt-ud-princippet. Besætningens sundhedsstatus var Blå SPF + MYC + AP12, og grisene i stort set alle sektioner modtog antibiotikabehandling mod fravænningsdiarré.

Baggrund

Besætninger med fravænningsdiarré har behov for løbende at afklare den bakterielle årsag, samt hvilke typer af antibiotika der kan anvendes som behandling. De fleste besætninger udtager typisk få gange årligt prøver til laboriemæssig undersøgelse – disse kan være gødningsprøver (sokkeprøver) eller obduktion af selvdøde eller aflivede grise med diarré. Dette materiale kan pege på, hvilken bakterie der højst sandsynligt er årsag til diarréen, og det er muligt at lave en antibiotika-resistensbestemmelse på denne bakterie. Diarré de første en-to uger efter fravænningsdiarré er ofte forårsaget af såkaldt hæmolytiske *E. coli* med virulensfaktorer (fimbrier = tilhæftningstråde (F4 eller F18)) og evnen til at producere forskellige giftstoffer (toksinerne ST og LT).

De centrale spørgsmål omkring diagnostikken er, 1) hvor retvisende er en enkelt prøve for den type *E. coli*, der er den sandsynlige årsag til diarréen, og 2) hvor konstant er antibiotika-resistensmønstret i en konkret besætning? Formålet med denne undersøgelse var derfor at belyse disse forhold.

Materialer og metoder

For at belyse de ovenstående spørgsmål præsenteres i det efterfølgende laborieresultater fra én smågrisebesætning, hvor der over ca. tre måneder løbende blev udtaget et stort antal sokkeprøver samt obduceret et tilsvarende stort antal grise med fravænningsdiarré.

Prøverne er udtaget i en besætning med otte smågrisesektioner á 22 stier, der foregik efter alt-ind-alt-ud-princippet. Én smågrisesektion blev opstartet om ugen. Bedriften havde 1.200 årssøer med en årsproduktion af 30-kgs grise på ca. 40.000. Besætningens sundhedsstatus var Blå SPF + MYC + AP12, og antibiotikabehandling mod fravænningsdiarré blev foretaget via drikkevandet i stort set alle sektioner.

I en seks-måneders periode (tre mdr. før undersøgelsen fra juni til august samt tre måneder under undersøgelsen fra september til november) blev følgende antibiotika ordineret og anvendt til behandling af smågrisene. Mod diarré ved vandmedicinering: Selectan® (florfenicol), Aivlosin® (tylvalosin), Neomay® (neomycin), Suprim® (sulfamethosol). Ved injektion: Borgal® (Sulfa + TMP) og Veticyclin prolongatum® (oxytetracyclin). Til behandling af andre sygdomme: ved vandmedicinering Citramox® (amoxicillin) og ved injektion Streptocillin® (DHS + penicillin).

På dagen for den første sti-vis flokbehandling i en smågrisesektion blev en sokkeprøve udtaget fra den eller de stier, der efterfølgende blev behandlet. Endvidere blev stort set alle grise, der pludseligt

døde de første en-to uger efter fravæning, obduceret. Alt materiale blev undersøgt på SEGES Laboratorium for Svinesygdomme, Kjellerup.

Beskrivelse af laboratorieanalyser (qPCR, PCR, dyrkning, MIC)

E. coli blev isoleret ved at dyrke materiale på agarplader. Materialet stammede enten fra en sokkeprøve eller fra en tarm med patologiske (sygelige) forandringer udtaget fra en selvdød gris med colidiarré. Der blev dyrket aerobt for *E. coli* ved at dyrke både på Drigalski-plader (et internt selektivt og indikativt medium for coliforme bakterier) og blodagarplader (Columbia agar (Oxoid) suppleret med 5 % kalveblod). Pladerne blev herefter inkuberet i 24 timer ved 37 °C. Efter inkubation blev et enkelt isolat med hæmolytisk aktivitet fra hver prøve analyseret ved realtime PCR til påvisning af virulensfaktorerne: F4, F18, ST1, ST2, LT og VT2e.

En sokkeprøve er en fæcesprøve udtaget ved at trække en speciel sok ud over støvlen og gå rundt i stierne i mange forskellige diarréklatter. Prøven indeholder derfor en blanding af fæces (gødning) fra mange grise, som kan være mere eller mindre syge. Det er derfor forventeligt, at prøven indeholder en kombination af bakterier, herunder ufarlige *E. coli*-isolater. Omvendt forventes det, at prøver udtaget fra grise, som er døde af colidiarré, indeholder flere af den sygdomsfremkaldende bakterie.

MIC er en forkortelse for Minimum Inhibitory Concentration. MIC-bestemmelser bruges til at undersøge bakteriers antibiotikafølsomhed. MIC-bestemmelse foretages ved at dyrke bakterien i 96 små brønde tilsat et vækstmedium med bestemte koncentrationer af antibiotika. MIC-værdien for det enkelte antibiotika er den laveste koncentration af antibiotika, der skal til for at forhindre bakterievækst i brøndene. For hver enkelt antibiotika findes der et 'break point', hvis MIC-værdien er mindre end eller lig med 'break pointet', er bakterien følsom (F). Hvis MIC-værdien er større end 'break pointet', er bakterien resistent (R).

Resultater og diskussion

I løbet af september, oktober og november i 2018 blev 24 sokkeprøver undersøgt, og 49 smågrise blev obduceret (Tabel 1 og 2).

Tabel 1. Sokkeprøver fordelt på måneder.

Måned for undersøgelse	Antal sokkeprøver	Antal sokkeprøver med massiv vækst af hæmolytiske <i>E. coli</i>	Antal hæmolytiske <i>E. coli</i> -isolater med resistensbestemmelser (MIC)
September	10	5	7
Oktober	12	11	12
November	2	0	2
Total	24	16	21

Tabel 2. Obducerede grise med colidiarré fordelt på måneder.

Måned for undersøgelse	Antal grise	Antal grise med klassisk fravænningsdiarré	Antal hæmolytiske <i>E. coli</i> -isolater med resistensbestemmelser (MIC)
September	18	7	4
Oktober	21	9	3
November	10	10	3
Total	49	26	10

Fund af hæmolytiske *E. coli* (virulensfaktorer)

Igennem hele undersøgelsesperioden blev hæmolytiske *E. coli* forholdsvis konstant isoleret og ofte i en massiv mængde.

Der blev undersøgt for virulensfaktorer ved PCR fra *E. coli*-isolater dyrket fra henholdsvis 24 sokkeprøver og ni obducerede grise (Tabel 3).

Tabel 3. Fund af virulensfaktorer.

Virulensfaktor	Positive ud af 24 sokkeprøver (%)	Positive ud af ni obducerede grise (%)
F4	0 (0 %)	0 (0 %)
F18	22 (92 %)	9 (100 %)
ST1	2 (8 %)	0 (0 %)
ST2	3 (13 %)	7 (78 %)
LT	22 (92 %)	9 (100 %)

Der blev fundet et meget ensartet virulensmønster over tid (F18 og LT). Forekomst af toksinet ST2 blev dog fundet oftere i *E. coli* fra obducerede grise (78 %) end fra sokkeprøver (13 %).

Resistensforekomst hos hæmolytiske *E. coli*

Prøverne omfatter resultater af resistensundersøgelser for 15 forskellige antibiotika: ampicillin, apramycin, amoxycillin & clavulan, ciprofloxacin, colistin, florfenicol, cefotaxime, gentamicin, neomycin, sulfamethoxazole, spectinomycin, streptomycin, tetracyclin, trimethoprim og ceftiofur.

Prøverne er undersøgt for at kunne påvise, 1) om resistensen ændres over tid, 2) om prøver undersøgt fra samme sag varierer i resistens, og 3) om prøver fra sokker og obducerede grise varierer i resistens. Denne undersøgelse omfatter kun klart følsomme eller resistente isolater, hvorfor de få isolater med en middel følsomhed ikke er inkluderet.

Resistensforhold over tid

For hele den undersøgte periode på tre måneder fandtes konstante resistensforhold for ni ud af de 15 antibiotika. De undersøgte *E. coli* var i alle tilfælde resistente for fire typer antibiotika (ampicillin, sulfa, spectinomycin, streptomycin), og fuldt følsomme for fem (amoxycillin & clavulan, colistin, ciprofloxacin, cefotaxime og ceftiofur). I besætningen ophørte brugen af sulfa til behandling af diarré i oktober. I hele perioden fra juni-november blev amoxicillin anvendt til behandling af hjerne- og ledbetændelse.

For seks antibiotika fandtes en *varierende* følsomhed (Tabel 4). Alle disse er samtidigt de klinisk relevante, da de ofte anvendes til behandling af *E. coli*-fravænningsdiarré. I besætningen blev tre af disse antibiotika anvendt til behandling af diarré: florfenicol, neomycin og trimetoprim.

Tabel 4. *E. coli* resistens overfor antibiotika – angivet som % resistente isolater og i parentes som antal resistente (R)/antal følsomme (F). Rød skrift indikerer en stigende resistenstendens over tid, mens blå skrift indikerer en faldende resistens tendens over tid.

Måned	Antal MIC	Apramycin	Florfenicol	Gentamicin	Neomycin	Tetracyclin	Trimetoprim
September	11	73 % (8R/3F)	0 % (0R/11F)	73 % (8R/3F)	73 % (8R/3F)	82 % (9R/2F)	27 % (3R/8F)
Oktober	15	67 % (10R/5F)	33 % (5R/10F)	67 % (10R/5F)	40 % (6R/9F)	60 % (9R/6F)	47 % (7R/8F)
November	5	60 % (3R/2F)	80 % (4R/1F)	60 % (3R/2F)	20 % (1R/4F)	60 % (3R/2F)	80 % (4R/1F)

Gennem den tremåneders periode, hvor undersøgelserne blev gennemført, sås således **stigende resistens** for to antibiotika (florfenicol og trimetoprim) og **faldende resistens** for ét antibiotikum (neomycin). Det er interessant, at de to antibiotika med stigende resistens blev taget i brug i september og anvendt i perioden september-november (florfenicol) og september-oktober (trimetoprim). Neomycin med faldende resistens blev anvendt i perioden juni-august.

Resistensforhold samme dag

I fem dage i løbet af undersøgelsesperioden blev mindst tre forskellige prøver (sokkeprøver og/eller grise) sendt til undersøgelse. Disse prøver fik alle et *E. coli*-isolat resistensbestemt (Tabel 5).

Tabel 5. Resistens i prøver undersøgt samme dag ved mindst tre prøver (kun antibiotika med tydelig variation). Tal i lysegrønne celler indikerer overensstemmende resultater mellem prøverne (R: resistente, F: følsomme).

Analysedato	Antal prøver	Apramycin	Florfenicol	Gentamicin	Neomycin	Tetracyclin	Trimetoprim
13.09.18	10	8R/2F	10F	8R/2F	7R/3F	8R/2F	2R/8F
04.10.18	4	4R	4F	4R	4R	4R	4F
25.10.18	3	3F	1R/2F	3F	2R/1F	3R	3R
26.10.18	4	4R	4R	4R	4F	4F	4R
28.10.18	3	1R/2F	3R	1R/2F	3F	2R/1F	3R

Set over alle fem analysedage og samtlige seks antibiotika, som udviste tydelig variation, fandtes overensstemmelse mellem de udtagne prøver i 67 % af tilfældene (lysegrønne celler). Derudover var der blot én dag med overensstemmelse mellem prøverne for ét antibiotikum (13.09.18), én dag med overensstemmelse mellem prøverne for tre antibiotikum (28.10.18), én dag med overensstemmelse mellem prøverne for fire antibiotikum (25.10.18), mens to dage udviste overensstemmelse mellem prøverne for alle seks antibiotika (4.10.18 og 26.10.18).

Resistensforhold for *E. coli* fra sokkeprøver og obducerede grise

I de to tilfælde, hvor der blev undersøgt mindst tre sokkeprøver og mindst tre obducerede grise inden for en todages periode, var resistensen i 25 % af undersøgelserne (tre ud af 12) markant forskellig i *E. coli*-isolaterne mellem sokkeprøver og obducerede grise (Tabel 7, lysegrønne celler).

Tabel 7. Resistens i prøver undersøgt ved mindst tre sokkeprøver og mindst tre obducerede grise (kun antibiotika med tydelig variation). Tal i lysegrønne celler indikerer forskellige resistensprofiler mellem sokkeprøver og obducerede grise (R: resistente, F: følsomme).

Analysedato	Antal prøver	Apramycin	Florfenicol	Gentamicin	Neomycin	Tetracyclin	Trimetoprim
13.09.18							
SOK	7	6R/1F	7F	6R/1F	4R/3F	5R/2F	6R/1F
Obduceret	3	2R/1F	3F	2R/1F	3R	3R	1R/2F
25./26.10.18							
SOK	4	4R	4R	4R	4F	3F	4R
Obduceret	3	3F	1R/2F	3F	2R/1F	3R	3R

Som det fremgår af Tabel 7, var resistensen overfor tre af de seks antibiotika i ét af tilfældene (25./26. oktober) helt forskellig mellem *E. coli* isoleret fra sokkeprøverne og fra de obducerede grise. Toksintyperne for *E. coli*-isolaterne var imidlertid forskellige mellem de to prøvetyper (de fire sokkeprøver: LT og de tre grise: ST2 og LT). Det kan heraf udledes, at resistensundersøgelserne blev foretaget på forskellige stammer/typer *E. coli*-bakterier.

Fund af andre diarrésmittostoffer

Fra sokkeprøverne blev der ved PCR fundet ganske få prøver med *Lawsonia intracellularis* (én med lavgradig forekomst) og *Brachyspira pilosicoli* (tre med lavgradig/moderat forekomst).

Konklusion

Undersøgelserperioden på små tre måneder viser en forholdsvis konstant forekomst af sygdomsfund ved obduktioner og ved bakteriologiske undersøgelser. Sygdomsfundene omfattede mange grise med fravænningsdiarré, og hæmolytiske *E. coli* med et relativt overensstemmende mønster af virulensfaktorer blev påvist i hovedparten af prøverne (F18 og LT toxin).

Med hensyn til resistensforholdene hos de isolerede *E. coli* ændrede disse sig markant over de tre måneder for enkelte antibiotika. Således sås en stigning fra 0 % til 80 % i resistensen overfor ét antibiotikum og et fald fra ca. 70 % til 20 % i resistensen (altså en stigende følsomhed) overfor et andet antibiotikum. Stigningen og faldet kunne relateres til henholdsvis ibrugtagen og udfasning af de pågældende antibiotika i besætningen. Resistensforholdene hos *E. coli* ser derfor ud til at kunne ændres relativt hurtigt inden for en besætning, i dette tilfælde over få måneder.

Endvidere fandtes det, at resistensmønstret baseret på flere prøver udtaget samme dag kunne variere mellem de forskellige prøver, og at resistensmønstret fra *E. coli*-isolater fra sokkeprøver og fra obducerede grise ikke altid er i overensstemmelse. Forklaringen på disse varierende fund fra prøver udtaget samme dag samt på forskelligt materiale er givetvis, at undersøgelserne reelt er foretaget på forskellige typer/stammer *E. coli*-bakterier.

Perspektivering

Denne relativt omfattende undersøgelse i én besætning over en kortere periode på små tre måneder giver særligt stof til eftertanke med hensyn til afklaring af, hvilke antibiotika der bør vælges til behandling af fravænningsdiarré.

På baggrund af undersøgelsen kan det anbefales at foretage hyppige resistensbestemmelser, og at valget af antibiotika baseres på mere end én resistentbestemt prøve. Endvidere bør der naturligvis

ved mistanke om helt eller delvist behandlingssvigt hurtigst muligt udtages nye prøver til resistensundersøgelse. Her kan resultatet af en undersøgelse, der blot er én måned gammel, være misvisende, hvorfor det er vigtigt, at prøverne analyseres kort efter udtagning for at give det mest retvisende billede.

Deltagere

Tekniker: Mogens Jakobsen

Statistiker:

Evt. andre deltagere:

Afprøvning nr. 1528

NAV nr.: 1305

//NIRW//

Dyregruppe: Smågrise

Fagområde: Sygdom, infektioner

Nøgleord: Fravænningsdiarre, E. coli, diagnostik, resistensbestemmelse



Tlf.: 33 39 45 00

svineproduktion@seg.es.dk

Ophavsretten tilhører SEGES. Informationerne fra denne hjemmeside må anvendes i anden sammenhæng med kildeangivelse.

Ansvar: Informationerne på denne side er af generel karakter og søger ikke at løse individuelle eller konkrete rådgivningsbehov.

SEGES er således i intet tilfælde ansvarlig for tab, direkte såvel som indirekte, som brugere måtte lide ved at anvende de indlagte informationer.