

FOREKOMST AF VIRULENSFAKTORER I HÆMOLYTISKE *E. COLI*-BAKTERIER ISOLERET FRA PATTEGRISE OG SMÅGRISE

Nicolai Rosager Weber og Svend Haugegaard

SEGES Svineproduktion, Den rullende Afprøvning

STØTTET AF

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

F4-positive *E. coli*-stammer findes oftest hos grise inden fravæning, mens der er en ligelig fordeling af F4- og F18-positive *E. coli*-stammer i nyfravænnede grise. Den hyppigst forekommende *E. coli*-type (43 % af alle patogene hæmolytiske *E. coli* stammer fra pattegrise og smågrise) er F4, ST2, LT.

Sammendrag

Formålet med denne undersøgelse var at kortlægge forekomsten af virulensfaktorer i hæmolytiske *E. coli*-stammer fra pattegrise og smågrise isoleret på Laboratorium for Svinesygdomme, SEGES i kalenderåret 2019.

Undersøgelsen der omfattede 253 *E. coli*-stammer viste, at F4-fimbriet var hyppigst forekommende hos grise inden fravæning, mens der var en ligelig fordeling af F4- og F18-positive *E. coli*-stammer i nyfravænnede grise. F18-positive *E. coli*-stammer dominerede i ældre smågrise.

F4, ST2, LT var den hyppigst forekommende *E. coli*-type, som udgjorde 43 % af alle patogene hæmolytiske *E. coli*, stammer fra pattegrise og smågrise isoleret på Laboratorium for Svinesygdomme, SEGES i kalenderåret 2019.

Lignende høj forekomst af hæmolytiske *E. coli*-stammer positiv for virulensfaktorerne F4, ST2 og LT er fundet i tidligere danske og europæiske undersøgelser af grise med fravænningsdiarré.

Resultaterne af denne kortlægning skal tolkes ud fra det faktum, at det kun er hæmolytiske *E. coli*-stammer, der indgik i undersøgelsen, samt der kun blev undersøgt for de mest almindelige forekomne virulensfaktorer. Undersøgelsen er baseret på indsendt materiale til Laboratorium for Svinesygdomme, SEGES, og er derfor ikke repræsentativt for hele den danske svineproduktion.

Baggrund

E. coli-bakterier er meget udbredt i svineproduktionen og er en del af den naturlige tarmflora i grise. Men bestemte typer af *E. coli* kan forårsage sygdom hos grise, som inkluderer pattegrisediarré, fravænningsdiarré, ødemsyge, blodforgiftning, ledbetændelse, yverbetændelse samt urinvejsinfektioner [1].

Der findes adskillige systemer til at klassificere *E. coli*-bakterier.

Historisk set er *E. coli*-bakterier blevet klassificeret ud fra tilstedeværelsen af specifikke overflade-proteiner (O-serotypning). Men Laboratorium for Svinesygdomme, SEGES klassificerer nu *E. coli*-bakterier med PCR-analyser, der kan påvise gener for de virulensfaktorer, der gør *E. coli* i stand til at fremkalde sygdom (fimbrie og toxin-gener).

Overordnet blev sygdomsfremkaldende *E. coli*-bakterier kategoriseret i patotyper, ud fra hvilken type sygdom bakterierne kan forårsage. Enterotoxigene *E. coli* (ETEC) er den vigtigste patotype i svineproduktionen, der kan forårsage pattegrisediarré og fravænningsdiarré. ETEC-bakterier tilhæfter sig tyndtarmens slimhinde via fimbrier (tilhæftningstråde), hvor F4 og F18 er de hyppigst forekommende fimbrier i grise. Efter tilhæftning frigiver ETEC-bakterierne enterotoxiner (giftstoffer), der forstyrrer væsketransporten over tarmvæggen, så der tabes mere væske til tyndtarmen, end der kan absorberes i tyktarmen. Resultatet bliver, at grisene får diarré, mister væske og dehydrerer. Der findes primært to hovedtyper af enterotoxiner, som spiller en rolle ved fravænningsdiarré i Danmark: ST (varmestabilt) og LT (varmelabilt) [1].

Shiga-toxin-producerende *E. coli* (STEC) er en anden vigtig patotype, som forårsager ødemsyge i grise. STEC-bakterier har, ud over fimbrier, også et meget potent toxin (shiga-toxin Vt2e), der forårsager karskader i grisen, så der udvikles ødemsyge.

STEC- og ETEC-bakterier kan have forskellige kombinationer af fimbrie og toxin-faktorer (virotyper), men fælles for STEC og ETEC er, at for at bakterierne skal være sygdomsfremkaldende, skal der være gener for både fimbrier og toxiner.

I langt de fleste tilfælde udviser *E. coli*-stammer af patotypen ETEC og STEC hæmolytisk aktivitet ved dyrkning på blodagarplade. Derfor er hæmolyse en god indikator for, om en *E. coli*-stamme er sygdomsfremkaldende (patogen) [2-4]. Hæmolyse betyder opløsning af røde blodlegemer. For at afgøre om *E. coli*-bakterier har hæmolytisk aktivitet, lader man bakterien vokse på en blodagarplade (foto 1). Hvis der opstår en lys zone rundt om bakteriekolonierne efter dyrkning, har bakterien været i stand til at opløse røde blodlegemer på agarpladen og har derfor hæmolytisk aktivitet.

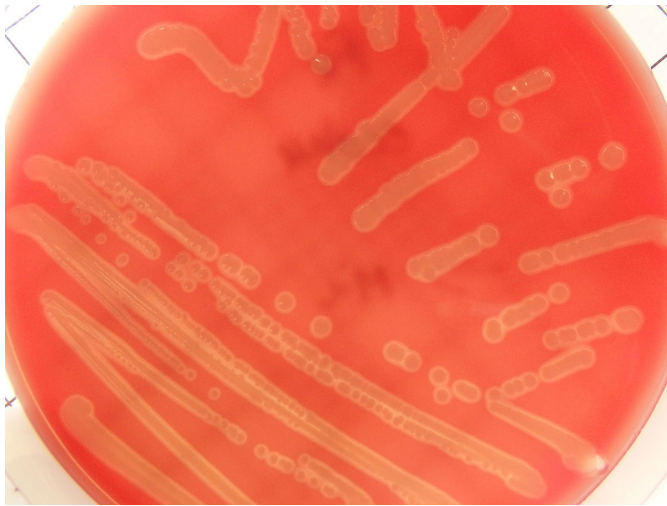


Foto 1: Vækst af *E. coli*-bakterier med hæmolytisk aktivitet efter dyrkning på blodagar plade (Foto: C. M. Salomonsen)

I Danmark bliver klassisk *E. coli*-betinget fravænningsdiarré oftest kontrolleret ved tilsætning af medicinsk zink til fravænningsfoderet. Derfor har der i lang tid været begrænset fokus på at undersøge, hvilke *E. coli*-stammer, der findes i grise omkring tidspunktet for fravænningsdiarré. Men da brugen af medicinsk zink skal udfases senest juni 2022, forventes det, at fravænningsdiarré igen bliver en stor udfordring for dansk svineproduktion. Udbrud af fravænningsdiarré vil ofte føre til reduceret tilvækst, øget dødelighed samt øget behov for antibiotikabehandling.

Den seneste danske kortlægning af *E. coli*-stammer, fundet i forbindelse med fravænningsdiarré, er 20 år gammel. For at kunne forebygge fravænningsdiarré er det vigtigt at vide, hvilke *E. coli*-stammer der er mest udbredt hos unge danske grise, når der skal vælges forebyggende tiltag i form af vacciner eller specifikke fodringstiltag i den enkelte besætning.

Formålet med denne undersøgelse var at kortlægge forekomsten af virulensfaktorer i hæmolytiske *E. coli*-stammer fra pattegrise og smågrise isoleret på Laboratorium for Svinesygdomme, SEGES i kalenderåret 2019.

Materialer og metoder

Indsamling af *E. coli*-bakteriestammer

I løbet af 2019 er informationer fra *E. coli*-stammer indsamlet fra grise samt gødningsprøver indsendt til diagnostik på Laboratorium for Svinesygdomme, SEGES.

Årsagen, til at besætningsdyrlægen og/eller svineproducenten havde indsendt materiale til diagnostik, var langt overvejende på grund af problemer med diarré (44 %) eller øget dødelighed (43 %). Af øvrige indsendelsesårsager kan nævnes hjernehindebetændelse (10 %) og generel utrivlighed (5 %). Ved 8 % af indsendelserne var der ikke angivet en indsendelsesårsag.

Ved alle indsendelser, hvor der ud fra de kliniske observationer og obduktion (de patologiske fund) var mistanke, om at *E. coli* var et betydende smitstof, blev en hæmolytisk *E. coli*-stamme udvalgt. Alle *E. coli*-stammer med moderat til massiv hæmolytisk aktivitet blev herefter udvalgt. Til sidst blev der lavet en sortering, efter om der var angivet alder på grise ved indsendelse.

Aldersopdelingen blev kategoriseret på følgende måde:

- 1. leveuge
- 2. leveuge
- 3. leveuge
- >3. leveuge, men ikke fravænnet
- 1-10 dage efter fravænning
- > 10 dage efter fravænning og < 30 kg.

De valgte stammer blev PCR-testet for tilstedeværelsen af de mest almindelige virulensfaktorer grise i Danmark: F4, F18, LT, ST1, ST2 og Vt2e.

Isolation og karakterisering af *E. coli*-stammer

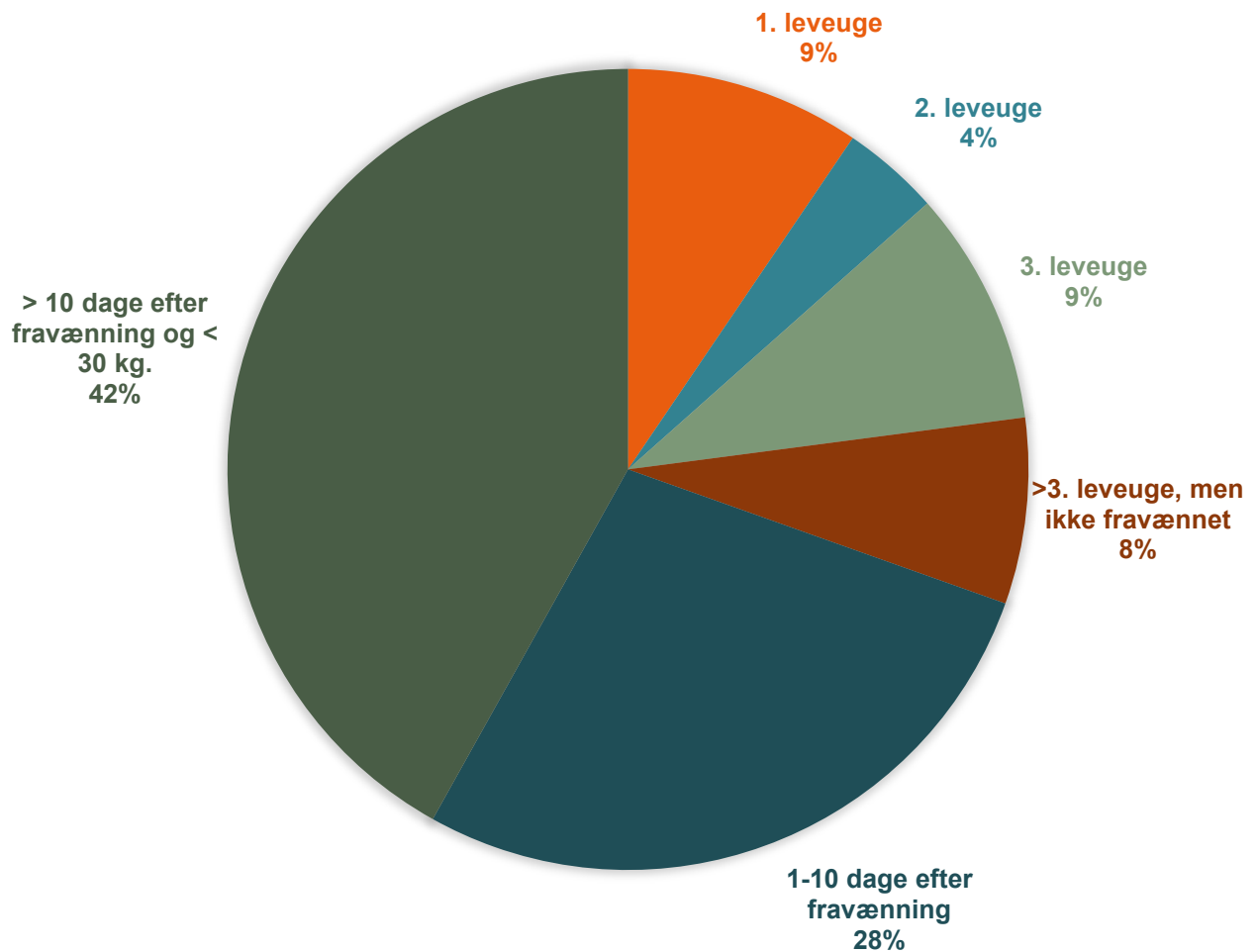
E. coli-stammerne blev isoleret fra relevant materiale og blev dyrket aerobt for *E. coli* ved parallel dyrkning på Drigalski (et internt selektivt og indikativt medium for coliforme bakterier) og blodagarplader (Columbia agar (Oxoid) suppleret med 5 % kalveblod). Pladerne blev herefter inkuberet i 24 timer ved 37 °C. Efter inkubation blev isolater med hæmolytisk aktivitet analyseret ved realtime PCR til påvisning af virulensfaktorgener F4, F18, ST1, ST2, LT og VT2e.

Resultater og diskussion

I alt indgik 253 *E. coli*-stammer med hæmolytisk aktivitet i undersøgelsen.

Materialet, hvorfra der blev isoleret *E. coli*-stammer, var overvejende fra indsendte grise eller tarmsæt 178/253 (70,4 %) mens 75/253 (29,6 %) af *E. coli*-stammer kom fra indsendte gødningsprøver eller rektalsvabere.

I undersøgelsen indgik *E. coli*-stammer fra grise i alderen fra fødsel til cirka 30 kg levende vægt. Figur 1 viser fordelingen af *E. coli*-stammer i forhold til alder på grisen, hvorfra bakterien er isoleret. De fleste stammer (70 %), der indgår i denne undersøgelse, kom fra fravænnede grise.



Figur 1: Fordeling af hæmolytiske *E. coli*-stammer i forhold til alder på grisen, hvorfra bakterien er isoleret

Beskrivelse af isolater

Af de 253 stammer kunne 166 (65 %) klassificeres som patogene, fordi de var positive for enten F4- eller F18-fimbrie gener og et eller flere toxin gener.

Fordeling af fimbrier og toxiner

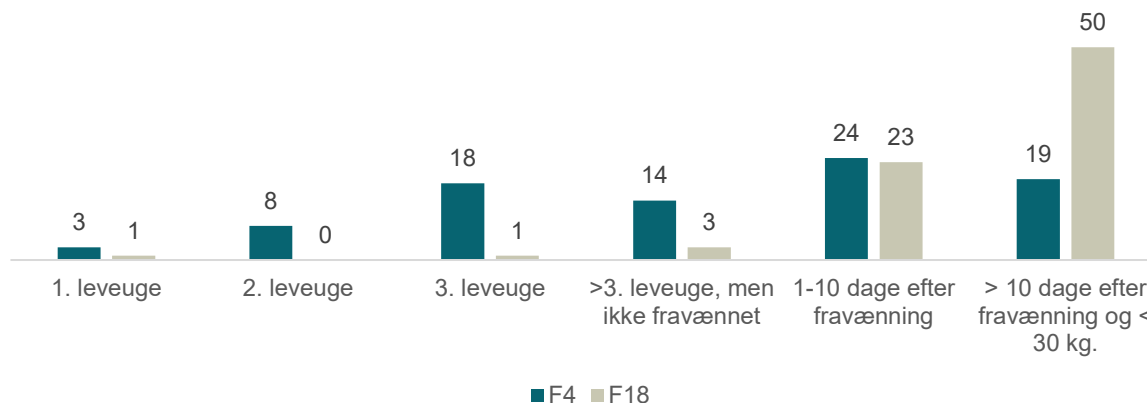
192 af 253 stammer (76 %) var positive for enten F4- eller F18-fimbrier med en overvægt af F18-positive stammer. De hyppigst forekomne toxiner var ST2, og LT, som blev fundet i henholdsvis 52,2 % og 42,7 % af alle stammer. VT2e-toxinet, som kan give ødemsyge, blev fundet i 13,8 % af stammerne.

Tabel 1: Forekomst af virulensfaktorer fra 253 hæmolytiske *E. coli*-stammer indsamlet i 2019

Virulens faktor		Antal positive stammer	% positive stammer
Fimbrie	F18	104	41,1
	F4	88	34,8
Toxiner	ST2	132	52,2
	LT	108	42,7
	ST1	49	19,4
	VT2e	35	13,8
	Total antal stammer	253	-

Figur 2 viser forekomsten af fimbrier F4 og F18 i forhold til alder. Som det fremgår, er F4 det dominerende fimbrie i stammer fra grise, som ikke havde været fravænnet. Derimod ses en ligelig

fordeling mellem F4- og F18-fimbrier i stammer fra nyfravænnede grise (1-10 dage efter fravæning). I ældre fravænnede grise er det F18-fimbriet, der dominerer. Resultaterne stemmer godt overens, med at grise generelt først udtrykker receptoren for F18-fimbriet i tyndtarmene ved 3-ugers alderen. Derved kan F18-positive *E. coli*-stammer ikke hæfte sig til tarmvæggen i yngre grise og dermed ikke give sygdom [1].



Figur 2: Forekomst af fimbrier i forhold til alder på grisen, hvor *E. coli* er isoleret

Fordeling af *E. coli*-typer

Undersøgelsen viste, at den hyppigst forekomne patotype var F4-ETEC, som udgjorde over halvdelen af alle patogene hæmolytiske *E. coli*-stammer i 2019, efterfulgt af F18-ETEC. F18-STEC patotypen, der kan forårsage ødemsyge, udgjorde knapt 17 % af stammerne. Kun fire stammer havde virulensfaktorer for både ETEC og STEC. Disse ETEC/-STEC-stammer har potentialet til at kunne forårsage både diarré og ødemsyge.

Tablet 2: Forekomst af patotyper fundet i hæmolytiske *E. coli*-stammer i 2019

Patotype	Antal	%
F4-ETEC	88	53,0
F18-ETEC	46	27,7
F18-STEC	28	16,9
F18-ETEC/STEC	4	2,4
Total	166	100,0

Den hyppigst forekomne virotype fundet i denne undersøgelse var F4, ST2, LT, som udgjorde knapt 43 % af alle patogene *E. coli*-stammer. Ved den seneste danske kortlægning af *E. coli*-virotyper i forbindelse med fravænningsdiarré og ødemsyge i 1999-2000 var F4, ST2, LT ligeledes den hyppigst forekomne virotype [2]. En nyere europæisk kortlægning fra 2012-2014 viste samme resultat, hvor den hyppigst forekomne virotype fundet i forbindelse med fravænningsdiarré var F4, ST2, LT [5].

I denne undersøgelse var alle F4-positive stammer positive for ST2-toxinet.

I forhold til F18-positive stammer var 78 ud af 104 (75 %) stammer positive for minimum et toxin gen. Vt2e-toxin genet blev kun fundet i F18-positive stammer.

Tabel 3: Fordeling af virotyper fundet i hæmolytiske *E. coli*-stammer i 2019 rangeret med faldende frekvens

Virotype	Antal isolater	%
F4, ST2, LT	71	42,8
F18, Vt2e	28	16,9
F18, ST2, LT	15	9,0
F18, ST1, ST2	14	8,4
F4, ST1, ST2, LT	14	8,4
F18, ST1	8	4,8
F18, LT	4	2,4
F18, ST2	3	1,8
F4, ST1, ST2	3	1,8
F18, ST1, ST2, LT	2	1,2
F18, ST1, ST2, Vt2e	2	1,2
F18, ST2, LT, Vt2e	2	1,2
Total	166	100,0

Konklusion

Denne undersøgelse viste, at det oftest var F4-positive *E. coli*-stammer, der blev fundet hos grise inden fravæanning, mens der var ligelig fordeling af F4- og F18-positive *E. coli*-stammer i nyfravænnede grise. F18-positive *E. coli*-stammer dominerede i ældre smågrise.

F4, ST2, LT var den hyppigst forekomne *E. coli*-type (virotype), som udgjorde 43 % af alle patogene hæmolytiske *E. coli*-stammer fra pattegrise og smågrise isoleret på Laboratorium for Svinesygdomme, SEGES i kalenderåret 2019.

Resultaterne af denne kortlægning skal tolkes ud fra det faktum, at det kun er hæmolytiske *E. coli*-stammer, der indgik i undersøgelsen, samt der kun blev undersøgt for de mest almindelige forekomne virulensfaktorer. Undersøgelsen er baseret på indsendt materiale til Laboratorium for Svinesygdomme, SEGES, og er derfor ikke repræsentativt for hele den danske svineproduktion.

Referencer

- [1] Fairbrother, J. M.; Nadeau, E. (2019): Colibacillosis. In: Zimmerman, J. J.; Karriker, L. A.; Ramirez, A.; Schwartz, K. J.; Stevenson, G. W.; Zhang, J. (Eds.), Diseases of Swine. John Wiley & Sons, Inc., p. 807-843.
- [2] Weber, N. R.; Nielsen, J. P.; Hjulsager, C. K.; Jorsal, S. E.; Haugegaard, S.; Hansen, C. F.; Pedersen, K. S. (2017): Comparison of bacterial culture and qPCR testing of rectal and penfloor samples as diagnostic approaches to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* in nursery pigs. *Prev. Vet. Med.* 143 (2017) 61–67.
- [3] Frydendahl, K. (2002): Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet. Microbiol.* 85(2): 169-182.
- [4] Luppi, A. (2017): Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance, *Porcine Health Manag.* 3:16.
- [5] Luppi, A.; Gibellini, M.; Gin, T.; Vangroenweghe, F.; Vandenbroucke, V.; Bauerfeind, R.; Bonilauri, P.; Labarque, G.; Hidalgo, Á. (2016): Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe, *Porcine Health Manag.* 2:20.

NAV nr.: 150-1305

//JV//

Dyregruppe: Pattegrise og smågrise
Fagområde: Sundhed, Veterinær



Tlf.: 33 39 45 00

svineproduktion@seges.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.