

Diagnosticering af *Clostridium perfringens* type C infektion i neonatale grise

med real-time PCR og ELISA

De næste 25 min...

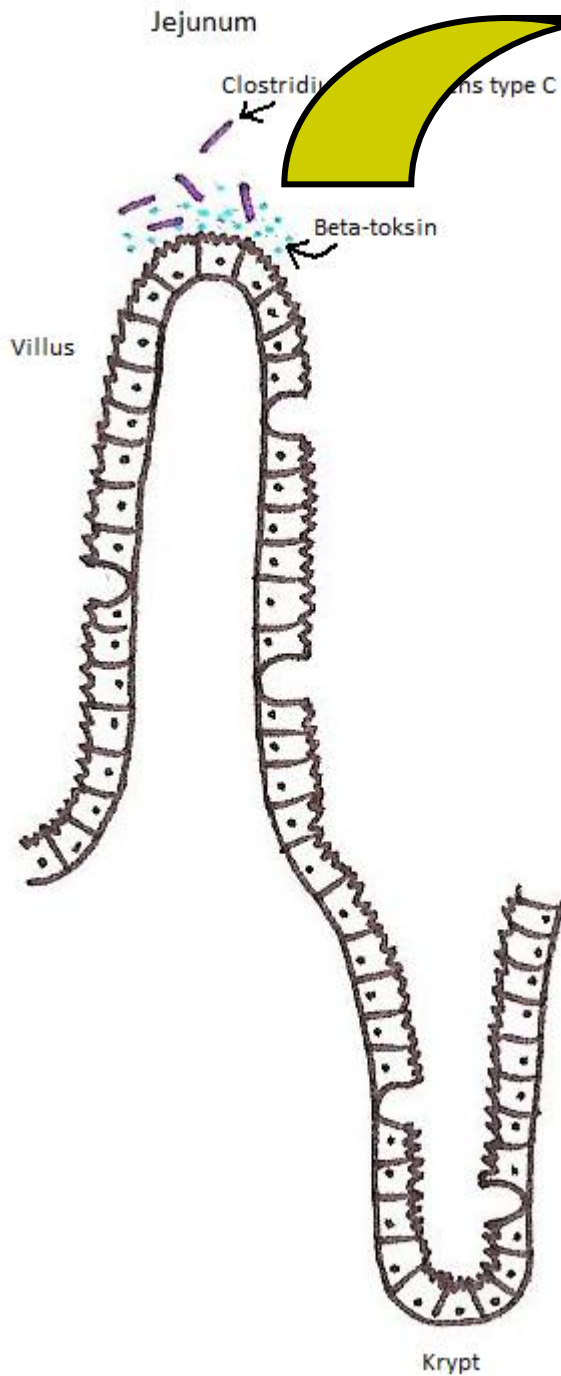
- Baggrund
- Formål
- *Clostridium perfringens* type C og tarmbrand
- Prøvemateriale
- Metoder
- Resultater
- Diskussion
- Konklusion
- Perspektivering
- Afslutning og spørgsmål

Baggrund

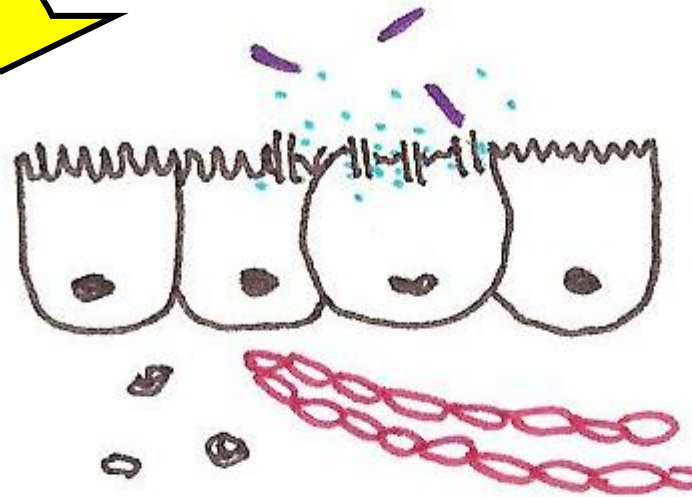
- Neonatal diarré projekt under VSP og DTU i 2011 fandt *Clostridium perfringens* type C (*CpC*) i 2 ud af 5 vaccinerede besætninger
- Rutinediagnostik i Danmark finder *CpC* 2-3 gange om året
 - Påvisning ved anaerob dyrkning og typebestemmelse af fire separate kolonier ved konventionel PCR/gelelektroforese)
- *Clostridium perfringens* type A påvises i ca. 80 % af indsendelser med anamnese om diarré i neonatal perioden

Formål

- At validere real-time PCR og ELISA metoder til diagnosticering af *CpC*
 - Grænseværdier
- At sammenholde resultaterne med traditionel diagnosticering (dyrkning og efterfølgende PCR/gelelektroforese)
 - Sensitivitet
 - Specificitet
- At sammenholde resultater med kliniske observationer



Dannelse af porer i membranen
--> Hævelse af afficeret celle



Lysering af celle og spredning via blodet
--> Hæmorrhagi og enterotoksæmi



Tarmbrand



Diarré indenfor 8-60 timer



Fibrinonekrotiserende enteritis med hæmorrhagi. Tarmvæggen er stiv med lokalt emfysem



Fibrinøs enteritis med emfysem i tarmvæggen



Fibrinonekrotiserende enteritis med striber på overfladen og stiv tarmvæg

Prøvemateriale

■ Real-time PCR

Antal	Materialetype	Alder (efter fødsel)	Oprindelse	Undersøgt, dyrkning
323	Svaber	1-5 og 10 dage	2 besætninger fra projekt	Ja, 9 grise: 5 positive
254	Svaber	3-5 dage	2 besætninger fra projekt	Ja, 16 grise: negative*
72	Tarmsæt	1-14 dage	Rutineindsendelser	Ja, alle: 1 positiv†
23	Pladevask	1-14 dage	Plader: udsæd fra tarmsæt	Ja, alle: 1 positiv†

* Negative for *C. perfringens* type C, men med massiv vækst af type A

† Samme journalnr. positiv, herunder både jejunum og colon fra tre grise (→ to tarmprøver og tre pladevask)

Prøvemateriale

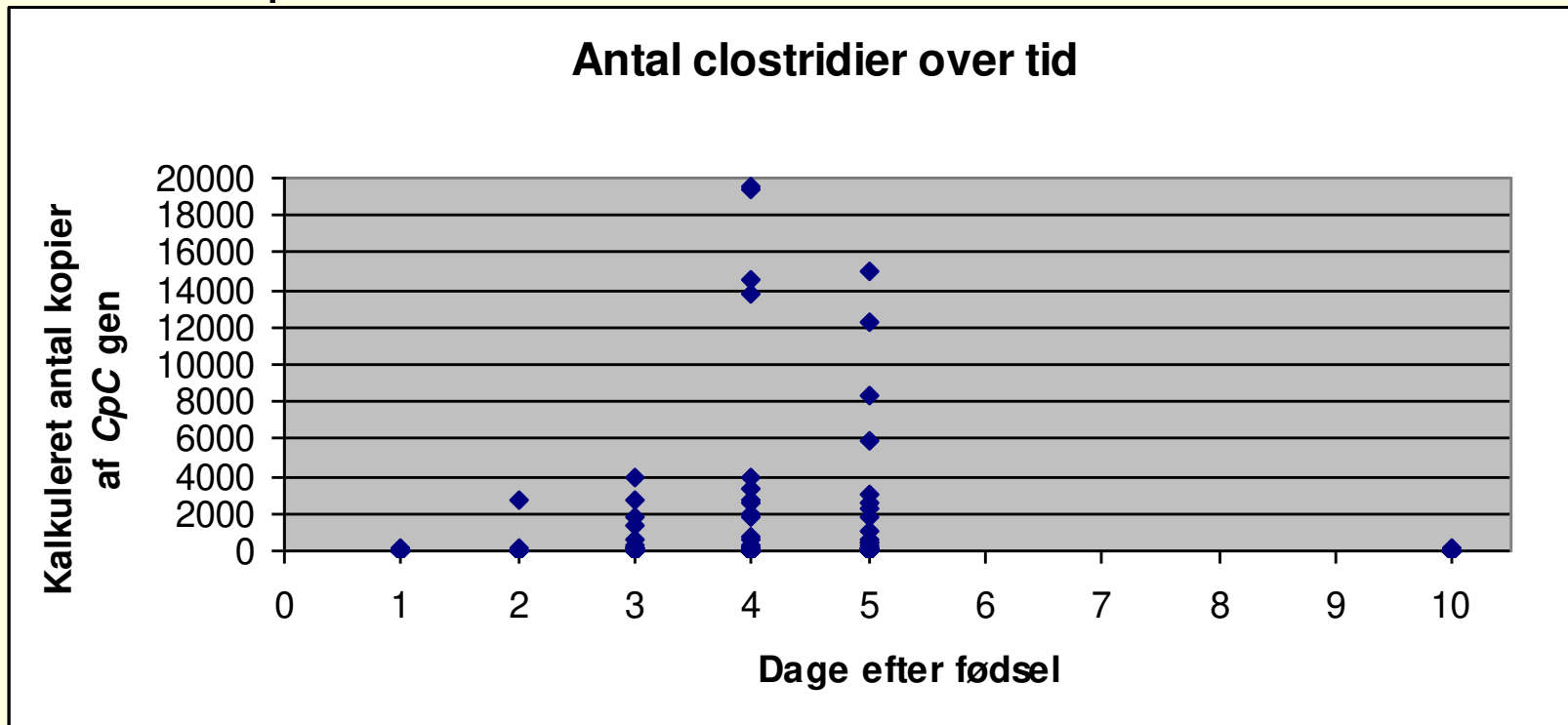
- ELISA: 176 prøver
 - 165 svaberprøver med > 6 kopier jf. real-time PCR resultater
 - 11 prøver fra tarmsæt og pladevask, mistænkt for at være positive

Metoder

- Real-time PCR udviklet af Albini *et al.* til påvisning af β -toksin genet
 - Svaberprøver: 1:40 fortynding og kogning
 - Tarmsæt: Pooling af op til fire prøver fra hver journalnr. og fæceskitoprensning
 - Pladevask: 1:10 + 1:100 fortynding og kogning
- Sandwich ELISA kit fra Bio-X Diagnostics til påvisning af β -toksin direkte fra prøvemateriale

Real-time PCR resultater

■ Svaberprøver



Udskillelsen af *Clostridium perfringens* type C er stigende med højeste koncentrationer 4-5 dage efter fødsel

Svaberprøver - fortsat

- Procentvis fordeling af real-time PCR positive svaberprøver

Positiv Signal =	≥ 1 kopi (pos. kuld)	≥ 8 kopier (pos. Kuld)	≥ 8 kopier (alle kuld*)
Dag	% positive	% positive	% positive
1	25,0	7,1	7,1
2	67,3	25,5	25,5
3	67,3	32,7	31,0
4	86,3	58,8	35,9
5	77,6	59,2	26,0
10	55,0	17,5	17,5

* Kuld fundet negative ved dyrkning fra to grise, blev fundet positive med real-time PCR

Real-time PCR resultater

■ Tarmsæt

- Én poolet tyktarmsprøve var positiv ved både dyrkning og real-time PCR
- Én poolet tyndtarmsprøve, der var positiv ved dyrkning var negativ
- Resterende prøver lå under detektionsgrænsen og var negative

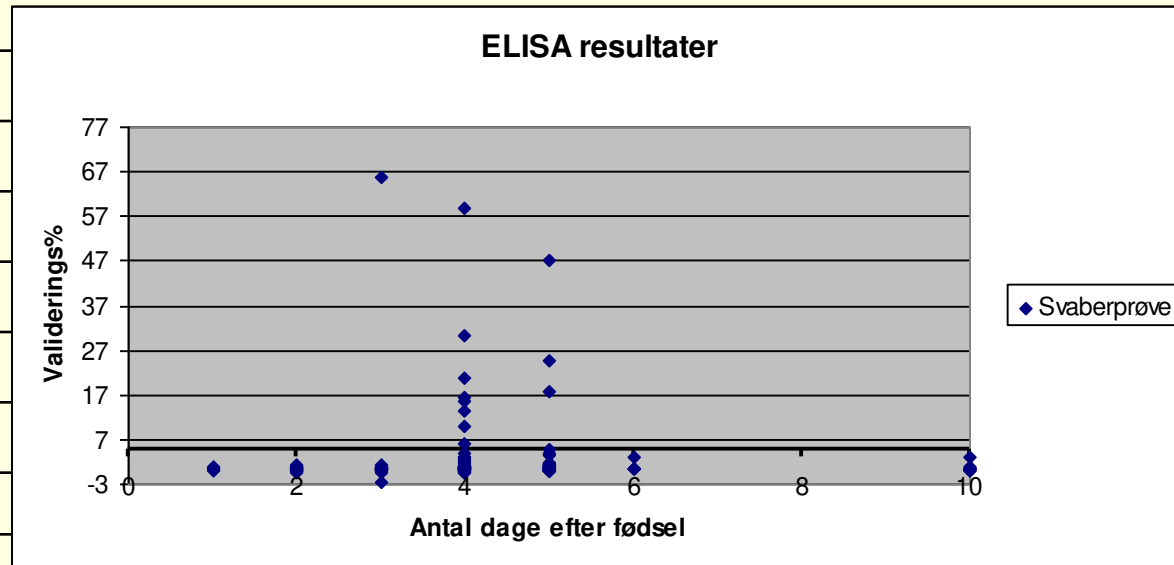
■ Pladevask

- 3 ud af 23 prøver var positive – som dyrkning

ELISA resultater

- Svaberprøver positive for β -toksin

Validerings%	Antal	%
< 1	130	73,9
$\geq 1, < 2$	19	10,8
$\geq 2, < 3$	7	4,0
$\geq 3, < 4$	5	2,8
$\geq 4^*$	15	8,5
I alt	176	



* Val% > 4,95 % = positiv prøve (indsat linje på grafen)

Færre positive prøver, men samme fordeling med højeste koncentrationer omkring dag 4 og 5

Sammenligning af resultater

- Real-time PCR vs. ELISA
 - Samme fordeling af positive prøver på dagene efter fødsel (cut-off = 8 kopier)
 - Resultater i 2x2 tabel:

		Real-time PCR		I alt
		Positive	Negative	
ELISA	Positive	13	2	15
	Negative	99	62	161
I alt		112	64	176

- Men... Sandsynligheden for at teste en prøve positiv for *CpC* er signifikant forskellig for de to metoder

Sammenligning af resultater

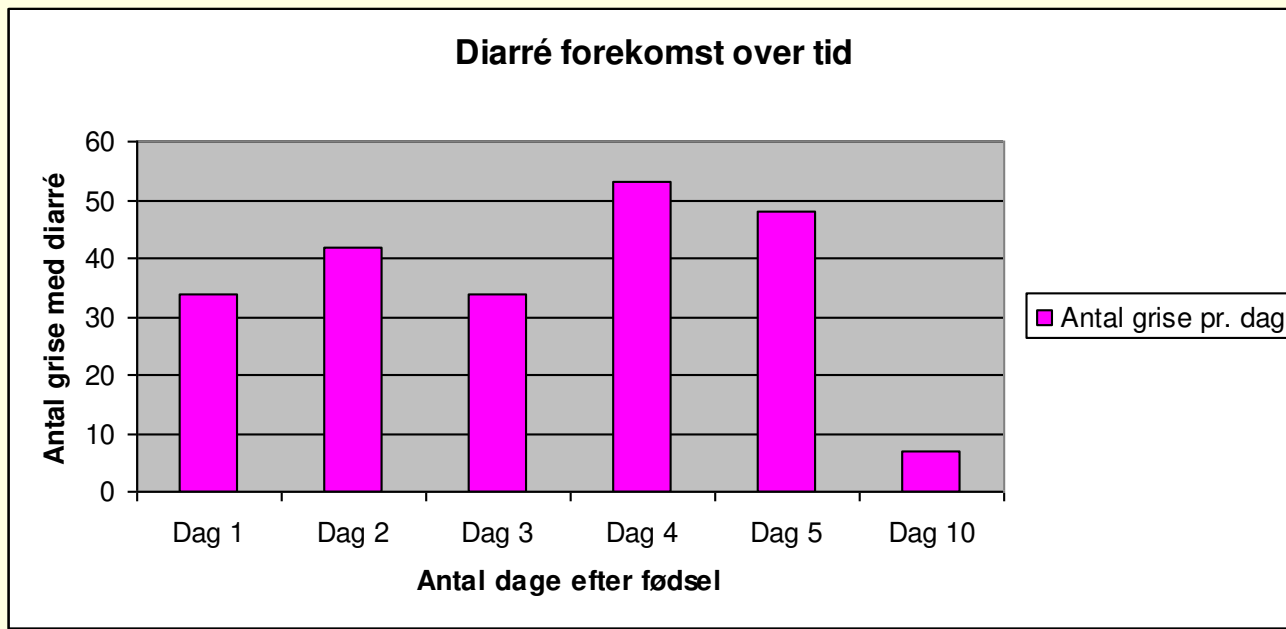
- Real-time PCR vs. dyrkning*
 - Resultater fra real-time PCR og dyrkning i 2x2 tabel

		Dyrkning + PCR		
		Positiv	Negativ	I alt
Real-time PCR (positiv \geq 8 kopier) alle dage	Positiv	4	6	10
	Negativ	1	14	15
	I alt	5	20	25

- Ingen signifikant forskel på sandsynligheden for at teste en prøve positiv for *CpC*.
- Real-time PCR mere sensitiv end dyrkningen

Sammenligning af resultater

- Real-time PCR vs. kliniske observationer*
 - Forekomst af diarré for hver af de undersøgte svaberprøver (547)



Real-time PCR vs. klinik - fortsat

- Sammenligning af real-time PCR resultater og forekomsten af diarré (case-kontrol opsætning)

**Cut-off ≥ 8
kopier**

**Eksponeret
for CpC**

		Sygdomsstatus		Total
		Diarré +	Diarré -	
Test +	50	100	150	
Test -	115	282	397	
Total	165	382	547	

- Oddsene for at have > 200 kopier er af β -toksin genet er $> 3,2$ gange større blandt grise med diarré i forhold til grise uden diarré
→ Ætiologisk fraktion: $\sim 70\%$ af diarré tilfældene i grise med > 200 kopier kan skyldes, at de er inficeret med *CpC*

Diskussion

- Svaberprøver: Højere koncentration af *CpC* på dag 3-5
 - For lav immunitet fra råmælk
 - Anden diarréårsag dag 1-2 → behandling → resistens → påvirkning af tarmfloraen
 - Produktion af toksiner som vaccinen ikke dækker

Diskussion

- Tarmprøver: Fund af *CpC* i tyktarm og ikke tyndtarm fra samme gris
 - Produktion af toksiner med virkning i tyktarmen
 - Flere inhiberende faktorer i tyndtarmsmateriale i forhold til tyktarmsmateriale

Diskussion

- Real-time PCR og ELISA: ingen korrelation imellem forekomst af β -toksin gen og β -toksin
 - Flere ganges optøning og nedfrysning
 - Nedbrydning af β -toksinet ved proteolyse
 - Tarmmotilitet fjerner β -toksinet fra bakterierne

Diskussion

- Real-time PCR og dyrkning: Ingen signifikant forskel på de to metoders effektivitet
 - Kun 25 prøver sammenlignet
 - Stadig højere sensitivitet for real-time PCR metoden, hvis en positiv prøve = infektion
 - Hvornår er en prøve positiv?
 - Vaccineret besætning?
 - Stor forskel på kliniske fund i de to besætninger

Konklusion

- Real-time PCR er anvendelig til diagnosticering på besætningsniveau
→ Mulighed for kvantificering og diagnostisk grænseværdi
- Real-time PCR er hurtigere, billigere, mere sensitiv og nemmere at udføre direkte på biologisk materiale
→ Risiko for detektion af raske smittebærere
- ELISA metodens anvendelighed er ikke entydig og kræver særlig håndtering af prøver pga β -toksinets hurtige nedbrydning
- Detektionsgrænse = 100.000 bakterier pr. g fæces
- Infektion med *CpC* er ikke et generelt problem i danske svinebesætninger
- Der kan være sammenhæng imellem antallet af bakterier og forekomsten af diarré i vaccinerede besætninger

Perspektivering

- Forbedring af sensitivitet ved at gentage prøver med værdier under 8 kopier (100.000 bakterier)
 - Diagnostisk betydning?
- Undersøgelse af en kvantitativ biologisk grænse for infektion af *CpC* i vaccinerede besætninger
 - Kan antallet af bakterier korreleres til forekomst af diarré eller spiller andre faktorer/patogener ind?
- Undersøgelse af *CpC* bakteriens affinitet for tyndtarm og colon
 - Har andre toksiner en større indflydelse end antaget?

Spørgsmål???



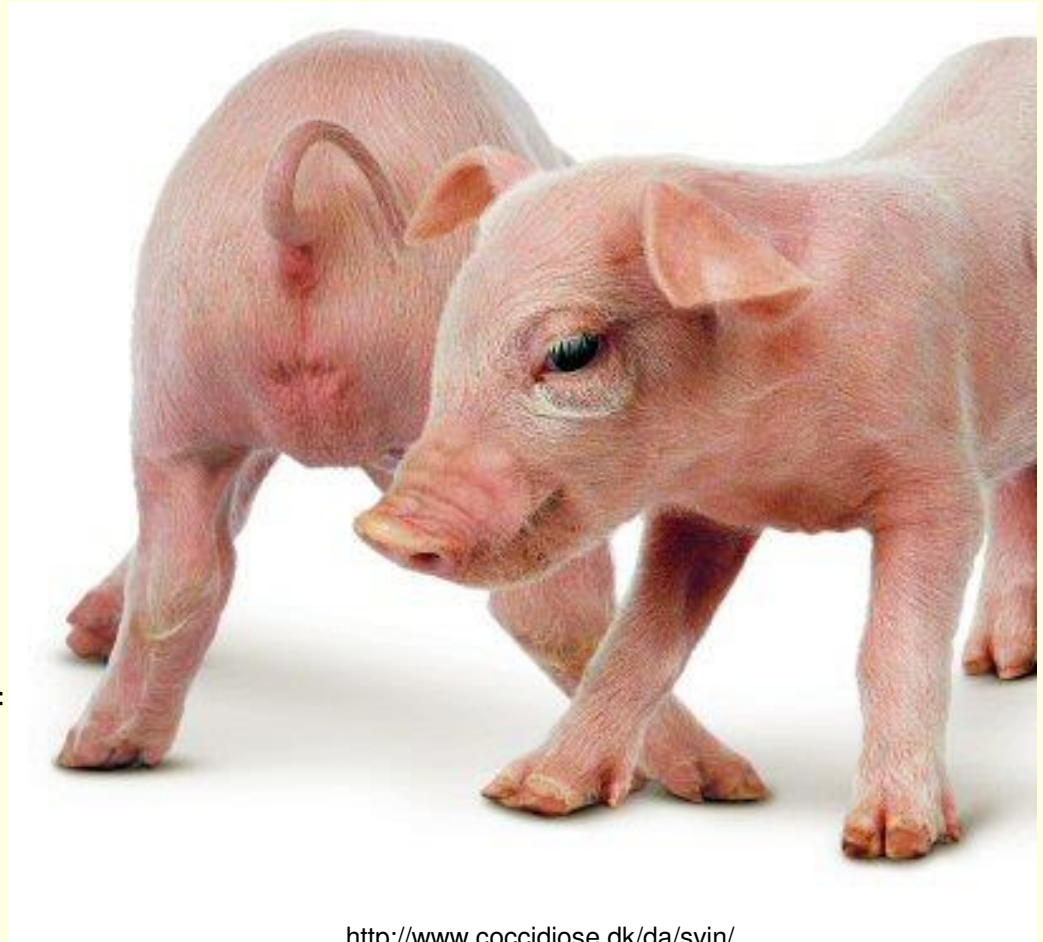
<http://s-dialog.dk/A-Thomas+Bak-Hvad-vil-S-egentligt-i-H%C3%B8je-Taastrup-Kommune-default.aspx?site=nykommune/thomasbak&func=article.view&id=412273>

Tak for opmærksomheden

Når enden er god er alting godt ☺

Tak til:

- Videntcenter for Svineproduktion, for finansiering af projektet
- Mine vejledere Branko Kokotovic og Hanne Kongsted
- NNPD projektet og Laboratorium for Svinesygdomme for udlevering og indsamling af prøver, data og billeder
- Bakteriologisk afdeling på DTU veterinærinstituttet



<http://www.coccidiose.dk/da/svin/>