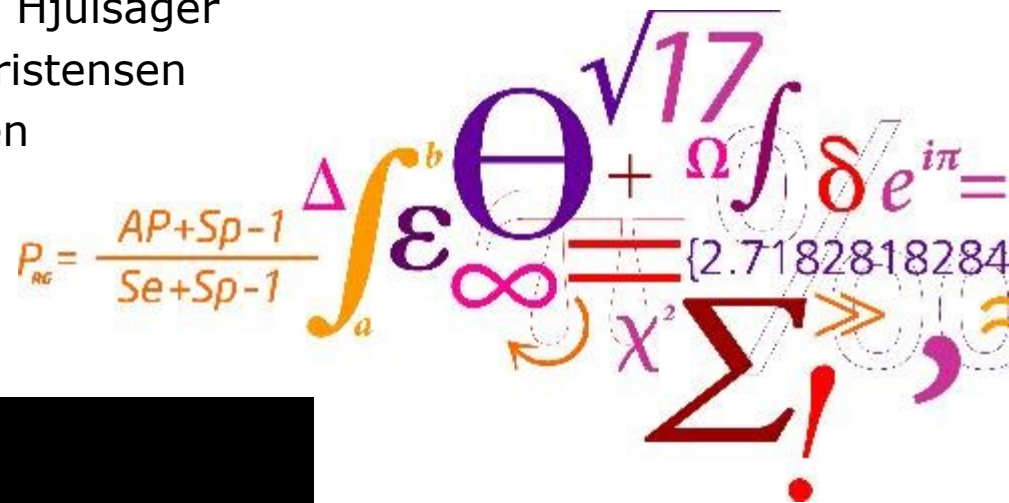


# Sundhedsovervågning hos klimagrise og slagtesvin ved udvidet laboratoriediagnostik

Thomas Kjeldsen Kusk  
Maja Kobberø

Hovedvejleder: Lars Erik Larsen  
Medvejledere: Nicole Bakkegård Goecke  
Charlotte Kristiane Hjulsager  
Charlotte Sonne Kristensen  
Ken Steen Pedersen



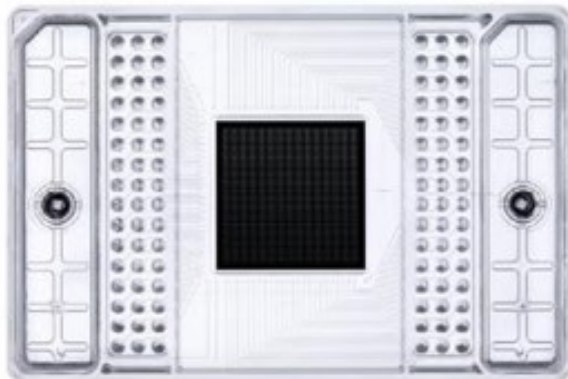
# Baggrund

- **High-throughput qPCR**

- 48.48 Dynamic array chip
- Kan analysere 48 forskellige prøver med 48 forskellige assays, dvs 2.304 reaktioner på én gang
- Mindre arbejdskrævende, reduceret forbrug af reagenter (nL vs.  $\mu\text{L}$ ) → billigere diagnostik

## Assay side:

- Primere
- Prober
- Assay loading reagent

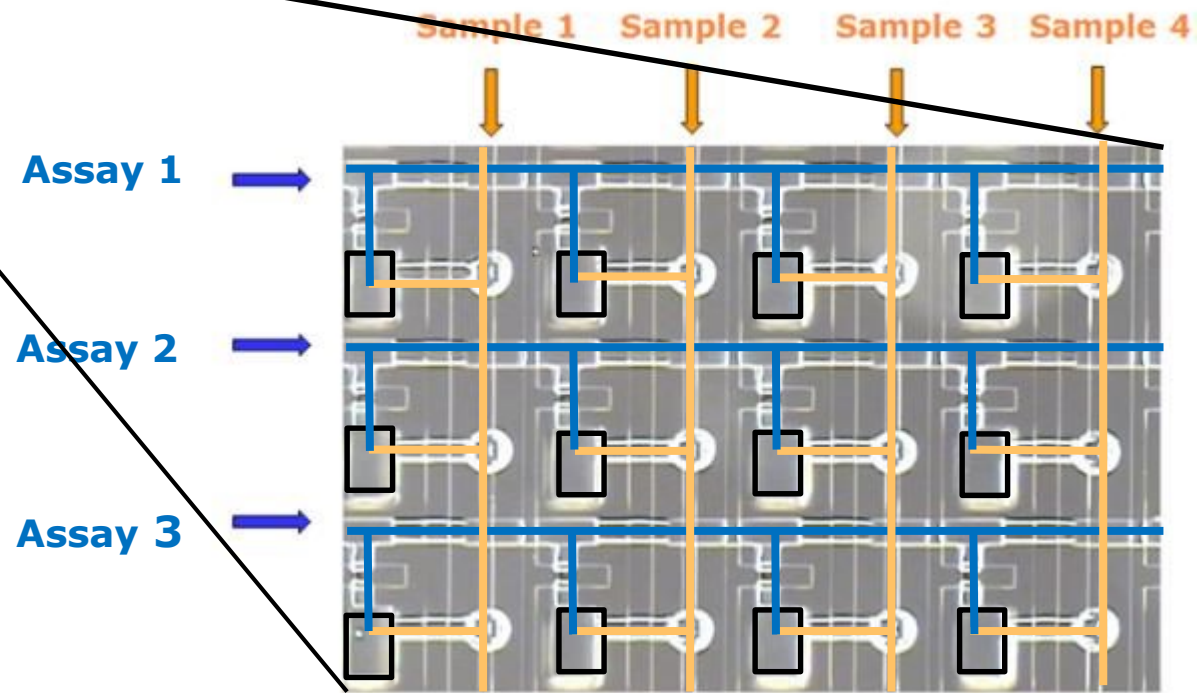
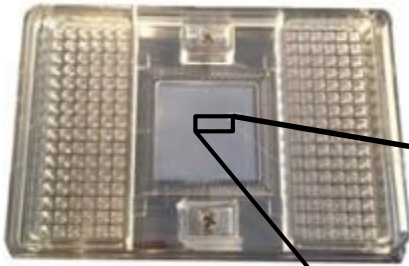


## Sample side:

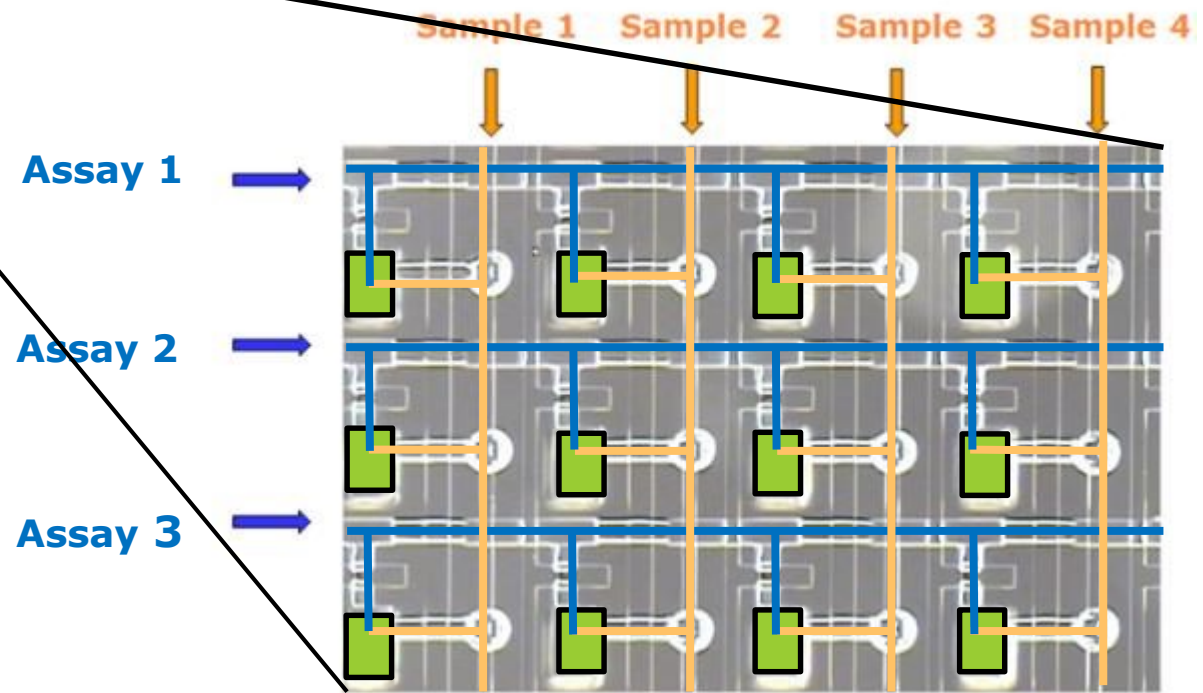
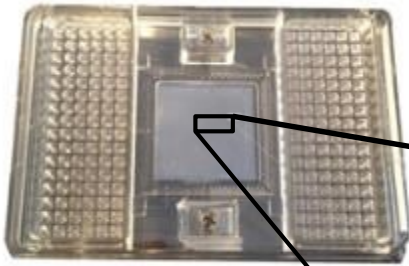
- Prøver
- Master mix
- Sample loading reagent



Source: <https://www.fluidigm.com/search?query=biomark>



Source: Nicole Bakkegård Goecke

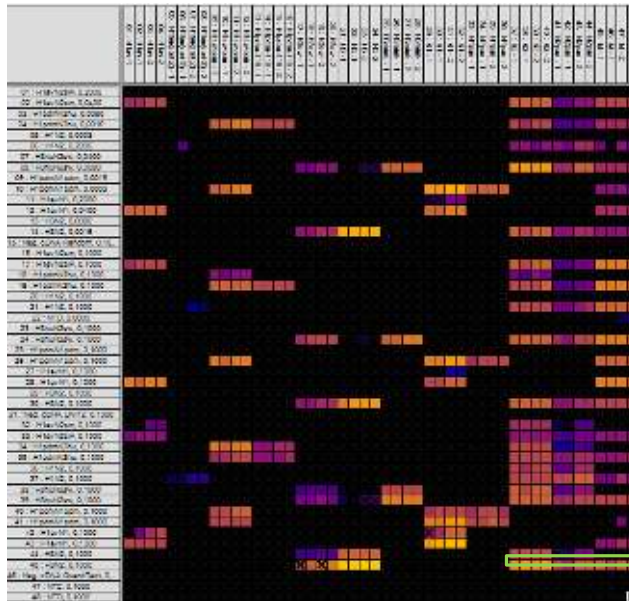


Source: Nicole Bakkegård Goecke

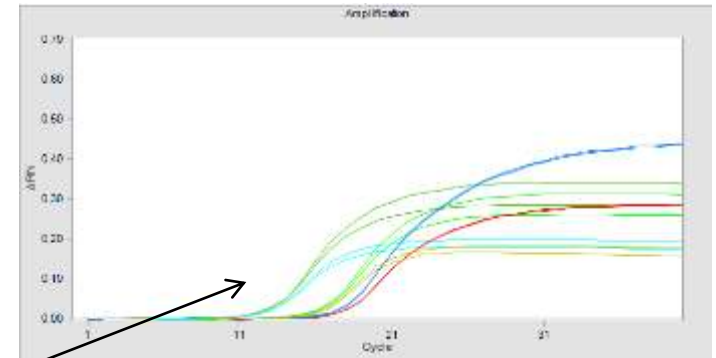
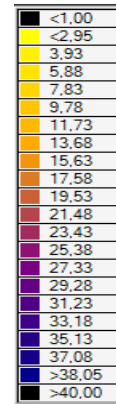
# Heat map

Assays

Samples

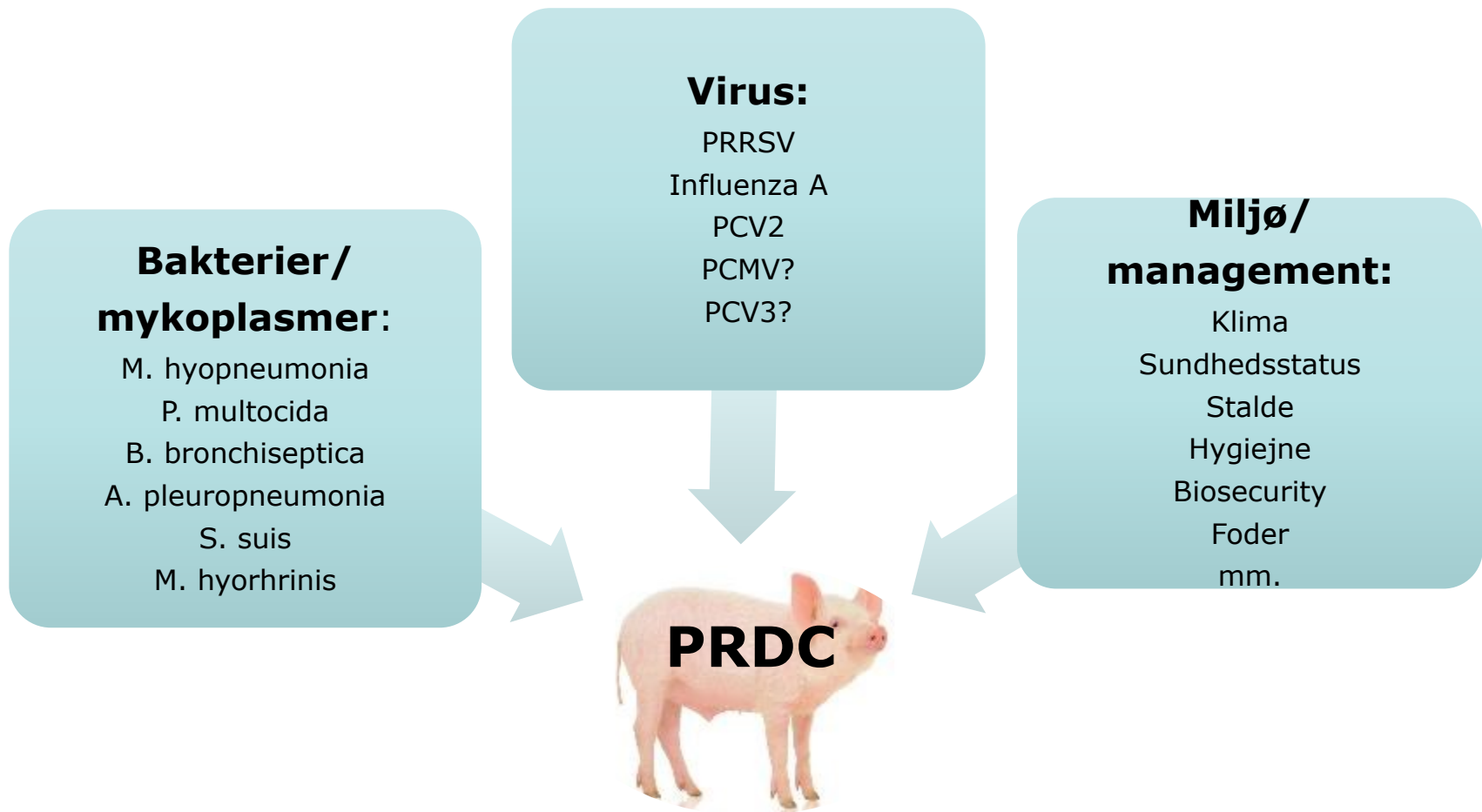


Ct values



Source: Nicole Bakkegård Goecke

# Porcine respiratory disease complex (PRDC)



Ofte grise 16-22 uger gamle

# Baggrund og formål

- **Baggrund:**

- Ny, billigere analysemetode:  
High-throughput qPCR
- Begrænset brug af laboratediagnostik
- Brug af sokke- og spytprøver
- Lettere at tolke laboratoriesvar ved sygdomsudbrud, hvis man har en ide om baseline af patogener under normale omstændigheder



- **Formål**

- 1. Etablere ny, billigere analysemetode (PhD Nicole Bakkegaard Goecke)
- 2. Undersøge om månedlig screening for patogener giver værdi i veterinær rådgivning

# Hypoteser

- **Hypotese 1**

- Månedlig diagnostisk overvågning, med brug af spytprøver, sokkeprøver og blodprøver i forskellige aldersgrupper, kan bruges som et værktøj i veterinær sundhedsrådgivning til at opnå en bedre forståelse af infektionsdynamikken.

- **Hypotese 2**

- Der er en signifikant korrelation mellem stier med hosteevents (hosteindex  $\geq 0,2$ ) og stier med påvisning af, eller høje niveauer af henholdsvis influenza A, pandemisk influenza, PCMV, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *A. pleuropneumoniae*, *S. suis* type 2, *P. Multocida*, *B. Bronchiseptica*, PCV2 og PCV3.

- **Hypotese 3**

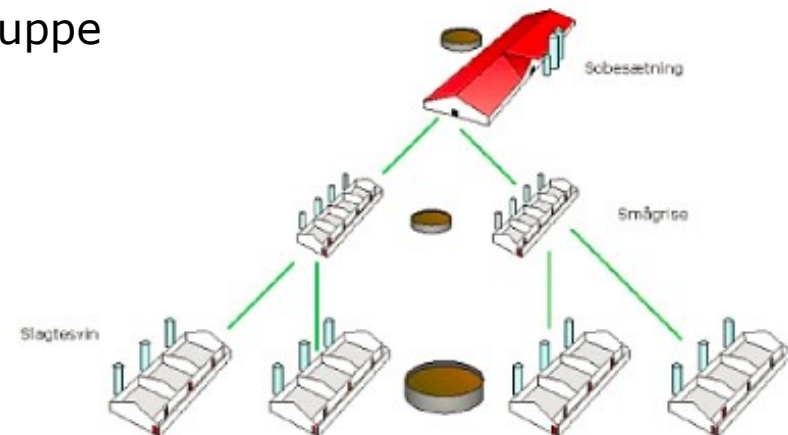
- Der er en signifikant korrelation mellem stier med diarréevents ( $\geq 0,1$  diarreklatte pr gris pr sti) og stier med påvisning af, eller høje niveauer af henholdsvis *B. pilosicoli*, *L. intracellularis*, *E. coli* F4, *E. coli* F18, PCV2 og rotavirus.



# Materiale og metode

## - Studiedesign

- Gentaget tværsnitsstudie
- Prøveindsamling i september, oktober og november 2017
- Besætninger
  - 6 klimastalde og 4 slagtesvinestalde
  - Aldersgrupper klimagrise: 2, 4 og 7 uger efter fravæning
  - Aldersgrupper slagtesvin: 2, 6 og 10 uger efter indsættelse
  - 2 stier tilfældigt udvalgt i hver aldersgruppe
  - 8 ud af 10 er SPF deklareret
  - Alle lokaliseret på Sjælland



# Materialer og metode - Prøvemateriale



Spytprøver



Sokkeprøver



Blodprøver

# Materiale og metode - Kliniske tegn



## Hosteevents

**Hosteindex  $\geq 0,2$**

*Tolstrup et al., 2017*

## Diarreevents

**$\geq 0,1$  diarreklat pr gris pr sti**

*Tolstrup et al., 2018*

# Undersøgte patogener

High-throughput qPCR sputprøver	High-throughput qPCR sokkeprøver	Rotor Gene qPCR sokkeprøver	ELISA og multiplex Spyt	ELISA blod
Influenza A	<i>E. Coli</i> F4, F18	PCV2	PRRSV	<i>M. hyopneumoniae</i>
h1pdm	<i>L. intracellularis</i>	<i>L. intracellularis</i>	APP 2,6,12	APP 2,6,12
PRRSV	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. pilosicoli</i>		Influenza A
PCMV	PCV2	<i>E. coli</i> F4		
APP	PPV	<i>E. coli</i> F18		
PCV2	PCV3			
<i>S. suis</i>	Rotavirus A			
PCV3				
<i>B. bronchiseptica</i>				
PPV				
<i>M. hyorhinis</i>				
<i>M. hyopneumoniae</i>				
<i>P. multocida</i>				

# Resultater

## - Oversigt

	<b>Total antal prøver</b>
Stier observeret for kliniske tegn	174
Spytprøver	172
Sokkeprøver	174
Blodprøver	330

# Resultater

## - Besætningsanalyse

### Klimagrise

- Skemaer over påvisning af agens i forskellige aldersgrupper



### Klimastald

Prøvetagningsdato	Metode	27/11 2017		27/11 2017		27/11 2017	
		sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
15	29	50					
Agens	Metode						
Influenza A	PCR, spyt (Ct)		22,85	15,86			
H1pdm (influenza)	PCR, spyt (Ct)						
PCV2	PCR, spyt (Ct)	19,73	20,21	24,16	22,98	15,86	15,54
	PCR, faeces (Ct) Log 10 kopier/g					18,99 (6,07)	20,34 (5,93)
PCV3	PCR, spyt (Ct)	25,02		24,91	27,88	27,55	
	PCR, faeces (Ct)				30,28		
App	PCR, spyt (Ct)				24,91		
App 2	EUSA, spyt (ODN)						
App 6	EUSA, spyt (ODN)						
App 12	EUSA, spyt (ODN)						
M.hyopneumonia	PCR, spyt (Ct)						
M.hyorhinis	PCR, spyt (Ct)						
P.multocida	PCR, spyt (Ct)	24,35		26,18			
S.suis 2	PCR, spyt (Ct)	19,79	21,51	21,69	21,97	22,73	21,82
B.Bronchiseptica	PCR, spyt (Ct)	27,82	27,69	26,17			
PCMV	PCR, spyt (Ct)	11	12,81	12,74	13,16		18,36
PPV	PCR, spyt (Ct)						
B.pilosicoli	PCR, faeces (Ct) kopier pr g./1000				20,81 (34,6)	16,2 (472)	21,2 (12,3)
L.intracellularis	PCR, faeces (Ct) kopier pr g./1000			24,93 (3,1)	19,94 (105)	14,38 (7050)	15,29 (4910)
E.coli F4	PCR, faeces (Ct) kopier pr g./1000	20,41 (8210)	21,77 (5040)	27,83			
E.coli F18	PCR, faeces (Ct) kopier pr g./1000	19,87 (8130)	22,08 (3040)				
Rotavirus A	PCR, faeces (Ct)	18,67	17,3	23,69		27,51	

	Stien er negativ for pågældende agens
	Stien er ikke analyseret for pågældende agens
	Stien er negativ for det pågældende agens, hvor aldersgruppen var positiv ved sidste prøvetagning
	Stien er positiv for pågældende agens, uden ændring i aldersgruppen siden sidste prøvetagning
	Nyt agens er påvist i aldersgruppen siden sidste prøveudtagning

# Resultater

## - Besætningsanalyse

- Eksempel på Influenza A i en klimastald

Prøvetagningsdato		26.09.2017		26.09.2017		26.09.2017	
Dage efter indsættelse		12		33		46	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
Influenza A	PCR, spyt (Ct)	11,56	10,35	20,96	27,97		

Prøvetagningsdato		24/10 2017		24/10 2017		24/10 2017	
Dage efter indsættelse		12		33		46	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
Influenza A	PCR, spyt (Ct)	16,97	15,76	20,07	25,63		

Prøvetagningsdato		24/11 2017		24/11 2017		24/11 2017	
Dage efter indsættelse		15		29		43	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
Influenza A	PCR, spyt (Ct)	12,08	10,58				

# Resultater

## - Besætningsanalyse

- Eksempel på moderate-høje forekomster af PCV2 i en slagtesvinestald

Prøvetagningsdato		27-09-2017		27-09-2017		27-09-2017	
Dage efter indsættelse		ca 14		ca 30		ca 56	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
PCV2	PCR, spyt (Ct)	13,72	14,41	14,36	24,43	19,54	20,27
	PCR, fæces (Ct) Log 10 kopier/g	16,62 (5,87)	16,78 (6,19)	15,92 (6,21)	17,12 (6,11)	20,79	21,3 (4,95)

Prøvetagningsdato		25/10 2017		25/10 2017		25/10 2017	
Dage efter indsættelse		14		42		62	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
PCV2	PCR, spyt (Ct)	11,54	11,88	12,55	18,98	16,4	15,6
	PCR, fæces (Ct) Log 10 kopier/g	13,94 (7,08)	12,83 (7,43)	15,95 (6,72)	19,94 (5,64)	19,56 (5,51)	17,83

Prøvetagningsdato		27/11 2017		27/11 2017		27/11 2017	
Dage efter indsættelse		19		40		68	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
PCV2	PCR, spyt (Ct)	9,01	8,5	18,48	17,97	17,41	12,99
	PCR, fæces (Ct) Log 10 kopier/g	10,67 (8,31)	10,22 (8,41)	19,78 (6,01)	19,95 (5,79)	22,85	18,81



# Resultater

## - Besætningsanalyse

- Eksempel på lave niveauer af PCV2 på en slagtesvinestald

Prøvetagningsdato		21-09-2017		21-09-2017		21-09-2017	
Dage efter indsættelse		15		35		ca 70	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
PCV2	PCR, spyt (Ct)	20,15					
	PCR, fæces (Ct) Log 10 kopier/g						25,48

Prøvetagningsdato		20/10 2017		20/10 2017		20/10 2017	
Dage efter indsættelse		14		44		64	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
PCV2	PCR, spyt (Ct)	21,83	26		16,78		
	PCR, fæces (Ct) Log 10 kopier/g	27,86					

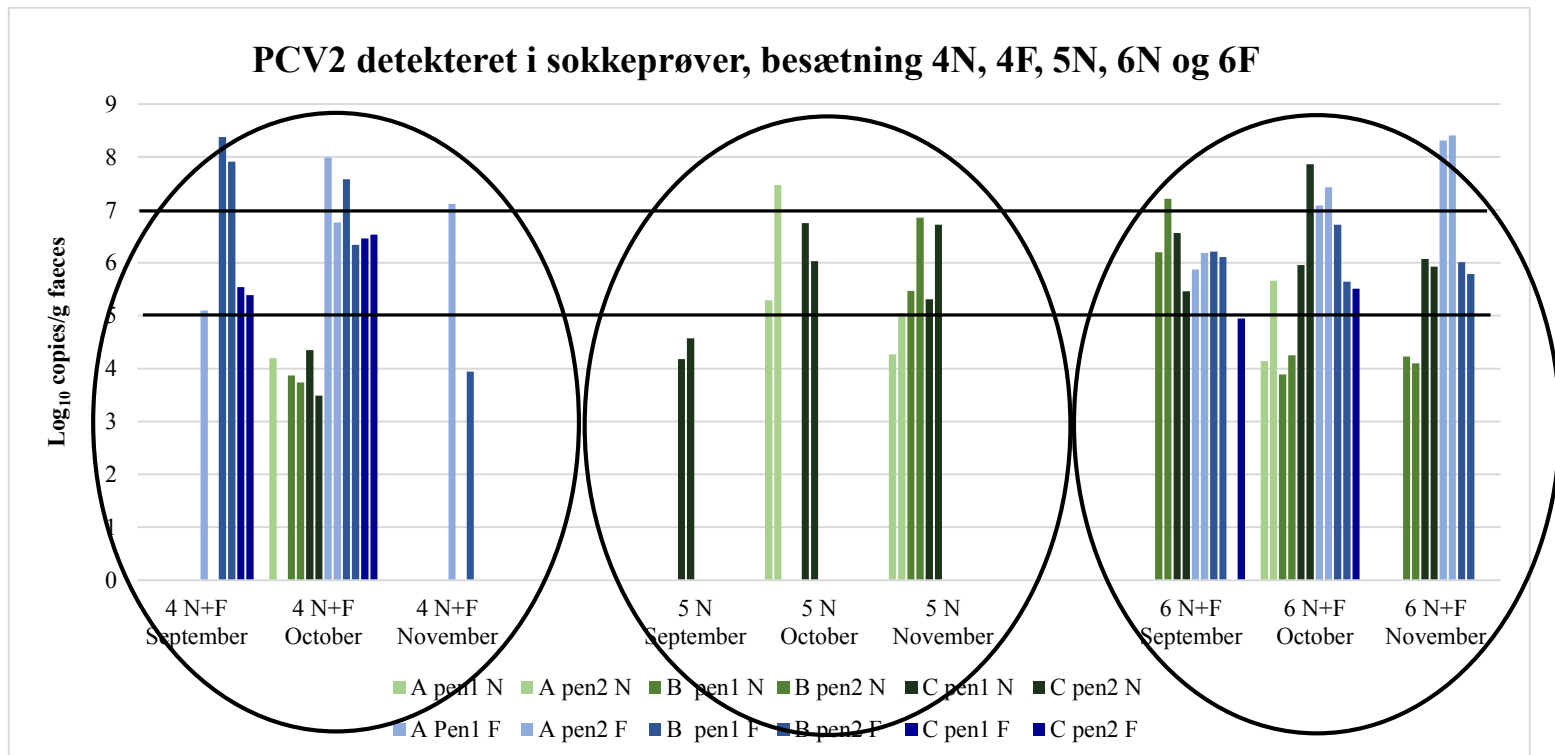
  

Prøvetagningsdato		22/11 2017		22/11 2017		22/11 2017	
Dage efter indsættelse		16		46		ca 70	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
PCV2	PCR, spyt (Ct)	19,73	23,11		28,48		
	PCR, fæces (Ct) Log 10 kopier/g	24,21 (4,46)		27,45 (3,87)	27,54		

# Resultater

## - Besætningsanalyse - samlet

- **PCV2:** Meget prævalent og i moderat-høje niveauer i 3 besætninger. I resten var det kun sporadisk, og ofte kun i én af de to stier i aldersgruppen.



# Resultater

## - Besætningsanalyse

- Eksempel på gastrointestinale bakterier i en klimastald

Prøvetagningsdato		27-09-2017		27-09-2017		27-09-2017	
Dage efter indsættelse		17		31		45	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
<u>B.pilosicoli</u>	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000			25,07	23,14 (2,24)	20 (8,55)	
<u>L.intracellularis</u>	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000			17,11 (515)	18,59 (144)	18,61 (100)	24,27 (4,86)
<u>E.coli F4</u>	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000						
<u>E.coli F18</u>	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000	20,84 (653)	23,33 (1300)				

# Resultater

## - Besætningsanalyse

- Eksempel på gastrointestinale bakterier i en klimastald

Prøvetagningsdato		25/10 2017		25/10 2017		25/10 2017	
Dage efter indsættelse		17		31		52	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
B.pilosicoli	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000			25,8	21,46 (9,76)	15,09 (680)	14,72 (950)
L.intracellularis	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000		14,66 (1980)		21,18 (20,4)	13,74 (5160)	19,65 (112)
E.coli F4	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000						
E.coli F18	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000	21,99 (643)	25,13				

Prøvetagningsdato		27/11 2017		27/11 2017		27/11 2017	
Dage efter indsættelse		15		29		50	
Agens	Metode	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2	sti 1	sti 2
B.pilosicoli	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000				20,81 (34,6)	16,2 (472)	21,2 (12,3)
L.intracellularis	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000			24,93 (3,1)	19,94 (105)	14,38 (7050)	15,29 (4910)
E.coli F4	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000	20,43 (8210)	21,77 (5040)	27,33			
E.coli F18	PCR, fæces (Ct) kopier pr g./1000	19,87 (8130)	22,08 (3040)				

# Resultater

## - Sammenhæng mellem patogener og hosteevents

8 hosteevents

- **Signifikant sammenhæng med:**

- Påvisning af **Influenza A** (p 0,02)
- Forekomst af **PCMV med Ct-værdi  $\leq 16$**  (p 0,001)
- Både **Influenza A og PCMV  $\leq 16$**  (p 0,003)

- **Ingen sammenfald med hosteevents:**

- *M. hyopneumoniae*, *B. bronchiseptica*, *P. Multocida*

- **Ikke signifikant sammenhæng med:**

- PCV2 med Ct-værdi  $\leq 18$ , PCV3 med Ct-værdi  $\leq 21$ , *M. hyorhinis* med Ct-værdi  $\leq 22$ , *A. pleuropneumoniae*.

# Resultater

## - Sammenhæng mellem patogener og diarréevents

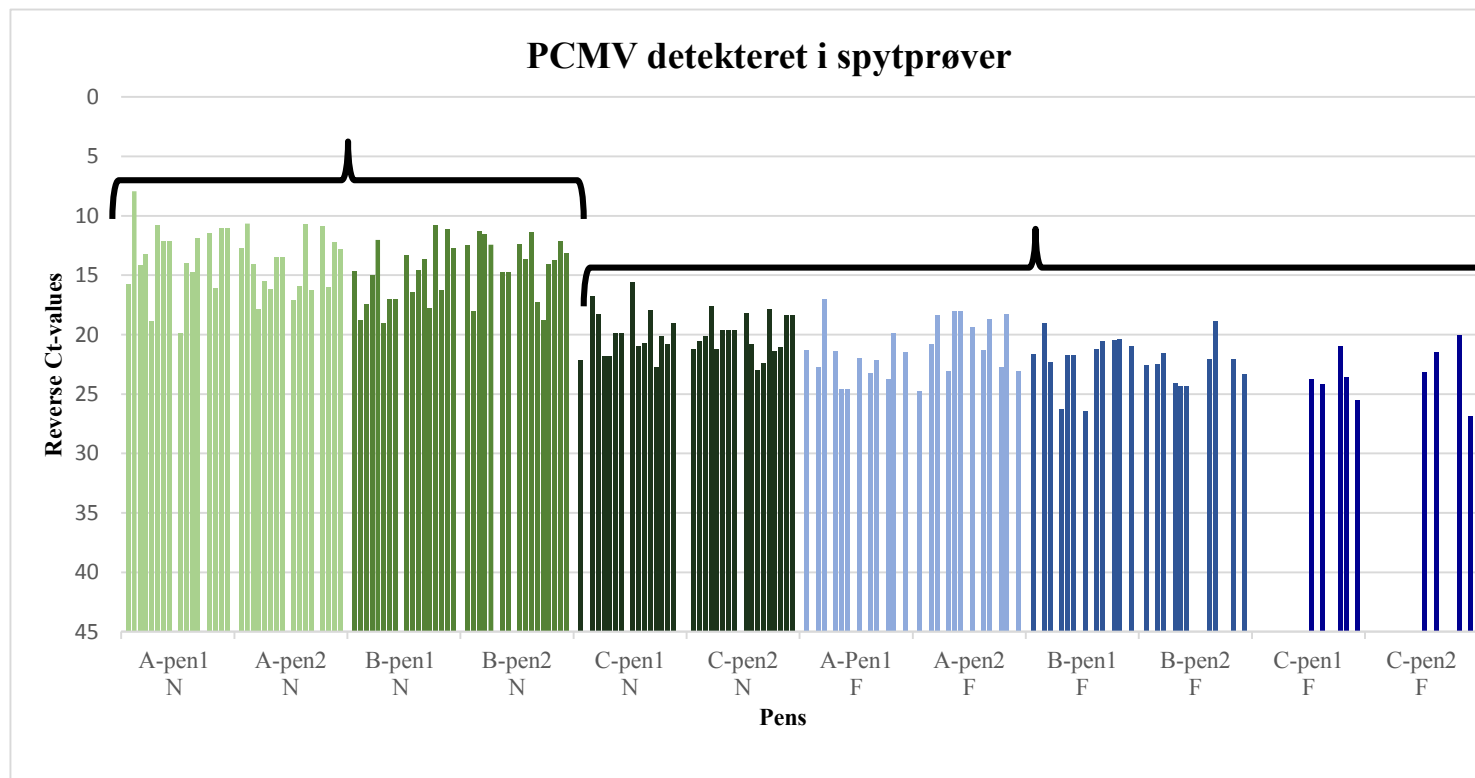
78 Diarreevents

- **Signifikant ( $p < 0,05$ ) korrelation med:**
  - *B. pilosicoli*  $\geq 10.000$  kopier/g fæces (p 0,006)
  - *B. pilosicoli*  $\geq 100.000$  kopier/g fæces (p 0,002)
  - *L. intracellularis*  $\geq 63.000$  kopier/g fæces (p 0,005) (Pedersen et al., 2013)
  - *L. intracellularis*  $\geq 1.000.000$  kopier/g fæces (p 0,01) (Pedersen 2014)
- **Ikke signifikant korrelation med:**
  - $\geq 35.000$  kopier/g fæces totalt af *E. coli* F4 og F18, *L. intracellularis* og *B. Pilosicoli* (Pedersen et al., 2014)
  - *E. coli* F4 og F18  $\geq 158.000$  kopier/g fæces (Weber et al., 2017)
  - PCV2
  - Rotavirus A

# Resultater

## - Besætningsanalyse - samlet

- **PCMV:** Næsten alle stier i alle besætninger.  
Høje niveauer i start til midt klimaperiode og lavere i sidste del af klimaperioden og op gennem slagtesvineperioden.



# Diskussion

## - Studiedesign

- **Gentaget tværsnitsundersøgelse**

- Prævalenser og ændringer heri over tid og aldersgrupper



- **Cut-offs**

- Begrænset evidens for brug af cut-off for hosteindex og diarre.
- Ingen cut-offs på ct-værdier for påvisning af agens i spyt

- **Kvantitative værdier**

- Kun Ct-værdier og ikke kvantitative værdier for spytprøver



- **Lav prædiktiv værdi ved påvisning af agens i spytpøver**
  - Påvisning af patogener på spyt ikke ensbetydende med sygdom
  - Begrænset viden om klinisk relevans for PRDC af visse patogener, eks. PCMV, *M.hyorhinis*, *S.suis*, *P. multocida* og *B. bronchiseptica*
  
- **Lav sensitivitet af detektion af spytpøver på PCR**
  - *A. pleuropneumoniae* og *M. hyopneumoniae*
  - Antistoffer på blod gav ikke yderligere information
  
- **Diarreevents**
  - Høj forekomst af gastrointestinale patogener ≠ med diarre.
  - Høj forekomst af diarre ≠ gastrointestinale patogener

# Konklusioner

- Identifikation af besætningsspecifikke infektionsmønstre
  - Forstå sygdomsdynamik i forskellige aldersgrupper i besætningen samt generelt på tværs af besætninger
  - Patogeners mulige sammenhæng til kliniske tegn, fx PCMV og influenza A
  - Mulige årsager til subklinisk sygdom, fx Influenza A og PCV2
  - Optimering af vaccination, antibiotikaforbrug og management
  - Kendskab til hvad der historisk har været i besætningen gør det lettere at finde årsagen til akutte problemer
- Objektivt brugbart værktøj som kan benyttes i sundhedsrådgivning

# Perspektivering

- Store besætninger med multisite produktion
- "Gult kort" ordning
- SPF
- Prøveudtagning af besætningsmedarbejderne, hvis blodprøver ekskluderes



Source: [https://www.google.dk/search?q=gul+kort&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewi36IXs4ffYAhWGCywKHb8ODsoQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgrc=BJH8KvbOKJ4n6M](https://www.google.dk/search?q=gul+kort&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewi36IXs4ffYAhWGCywKHb8ODsoQ_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgrc=BJH8KvbOKJ4n6M):



Source: <https://www.danishcrown.dk/om-os/datterselskaber/spf-danmark-as/>



Source: <http://www.wisegeek.com/what-is-financial-analysis.htm#difyouknowout>

## Stort tak til:

- Lars Erik Larsen
- Nicole Bakkegård Goecke
- Charlotte Hjulsager
- Charlotte Sonne Kristensen
- Ken Steen Pedersen
- Og alle landmændene

