

Rødsyge - serologiske profiler i vaccinerede danske sobesætninger



Dyrlæge Rikke Søgaard

Fagdyrlægeopgave

Vejleder: Professor Jens Peter Nielsen

Forord

Laboratorios Hipra, S.A fra Spanien etablerede i februar 2014 datterselskabet Hipra Danmark i DK. I forbindelse med Hipra Danmarks lancering af en ny rødsyge/parvo kombinationsvaccine samme år blev der udtaget serologiske profiler i 49 danske sobesætninger i perioden fra 4. november 2014 til 21. juli 2015. Af disse besætninger var det muligt at anvende data fra 31 besætninger svarende til 924 målinger for rødsyge antistoffer i avlsdyr. Alle avlsdyr var vaccinerede, men i hver seroprofil indgik desuden en gruppe ikke vaccinerede polte.

Ovennævnte datasæt ligger til grund for denne fagdyrlægeopgave, som også indeholder en litteraturred med en faglig opdatering på rødsyge infektioner, primært hos søer og med fokus på en ny inddeling af *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

En stor tak til alle medvirkende i projektet, og en særlig tak skal lyde til:

Mine 2 kollegaer i Hipra Danmark, Kirsten Larsen og Anne Mette Strunz for støtte og udtagning af blodprøver.

Anni Arvad Andersen, dyrlæge ved Vet-team og Gitte Blach Nielsen, dyrlæge i MSD for faglig sparring og hjælp til databehandling.

Irene Krøjer Hansen, dyrlæge ved Snertinge dyrehospital for sproglig sparring.

Og ikke mindst Jens Peter Nielsen, professor i svinesygdomme på KU LIFE, for stadigvæk at tro på projektet efter alle disse år.

SAMMENDRAG

Rødsyge skyldes den grampositive bakterie *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Bakterien findes hos mange forskellige dyrearter, både husdyr og dyr i naturen (fisk, fugle og gnavere). Mennesker kan desuden også blive smittet med rødsyge, og folk ansat i både fiskeindustrien og på slagterier har en øget risiko for at blive smittet. Bakterien overføres om oftest ved snitsår. Rødsyge er en almindelig forekommende sygdom hos svin med kliniske symptomer som feber, hudlæsioner, ledbetændelse og hjerteklapbetændelse. Dyrene smittes via miljøet eller ved direkte kontakt med smittebærere, og det formodes, at 30-50 % af grisene er raske smittebærere.

Erysipelothrix rhusiopathiae kan inddeles i forskellige serotyper, og der er defineret minimum 23 forskellige serotyper. Patogeniteten af rødsyge bakterien er afhængig af forskellige virulensfaktorer, deriblandt en af de proteiner som sidder på overfladen af cellen og hedder surface protective antigen (Spa). Der er 3 Spa typer, og de forskellige serotyper kan inddeles efter deres Spa type i enten type A, B eller C.

Alle avlsdyr i den danske svineproduktion vaccineres mod rødsyge. Ofte vaccineres der samtidig mod parvovirus i en rødsyge /parvovirus kombinationsvaccine, for at beskytte mod symptomer på klinisk rødsyge og parvovirus. Alle polte vaccineres 2 gange inden løbning, og dernæst revaccineres alle gylte og søer enten før eller efter hver faring. Der er flere forskellige vacciner på det danske marked, både kombinationsvacciner og monovalente rødsyge vacciner.

Grundlaget for denne opgave er en indsamling af rødsyge seroprofiler fra 31 danske sobesætninger, som anvendte en kombinationsvaccine mod rødsyge og parvovirus, i alt 924 blodprøve resultater. I hver profil var der en gruppe ikke vaccinerede polte samt forskellige aldersgrupper af vaccinerede gylte og søer til og med 6 læg. Den anvendte test var en indirekte ELISA, og analyserne blev foretaget på Laboratorios Hipra, S.A.'s diagnostiske laboratorium Diagnos i Spanien. Alle de dyr der indgik i undersøgelsen blev kategoriseret som enten seronegative eller seropositive, afhængig af den aflæste IRPC-værdi (relativ index x 100).

Konklusionen på undersøgelser er andelen af seropositive dyr blev højere med stigende alder pga. gentagende vaccinationer og øget eksponeringstid for rødsyge smitte i besætningen. Desuden blev der fundet signifikant forskel på andelen af seropositive dyr i de forskellige aldersgrupper. Denne forskel er afhængig af aldersforskellen mellem de grupper der sammenlignes. Der var også stor forskel på spredningen af aflæste IRPC- værdier i hver aldersgruppe i hver besætning. Denne spredning var størst i gruppen af søer 1-4 læg. En af kombinationsvaccinerne i undersøgelsen var ordineret til en procentvis større andel af avlsdyr sammenlignet med den tilsvarende procentvise andel ordineret til alle avlsdyr i Danmark. Ved en statistisk analyse var der dog ikke signifikant forskel på andelen af seronegative dyr, hvis dyr vaccineret med denne vaccine blev sammenlignet med dyr vaccineret med en af de andre kombinationsvacciner.

Indholdsfortegnelse

1	Indledning	5
1.1	Litteraturgennemgang	5
1.1.1	Introduktion	5
1.1.2	Inddeling i serotyper og SPA	5
1.1.3	Smitteveje og symptomer	8
1.1.4	Diagnostik	9
1.1.5	Udbredelse og Vaccination	10
1.2	Betydning	11
1.3	Relevans	11
2	Undersøgelse	12
2.1	Formål og Hypotese	12
2.1.1	Formål	12
2.1.2	Hypoteser	12
2.2	Population	13
2.2.1	Studie enhed	13
2.2.2	Mål population	13
2.2.3	Studie design	13
2.3	Dataindsamling	13
2.4	Beskrivelse af besætninger	15
2.5	Variabler	17
2.5.1	Serologisk undersøgelse	17
2.5.2	Typer af rødsyge vacciner anvendt	18
2.6	Deskriptiv analyse	19
2.6.1	Fordeling af og seronegative og seropositive dyr	19
2.6.2	Fordeling af data i grupperne	22
2.7	Data behandling og analytisk metode	25
3	Resultater	26
3.1	Prævalens	26
3.2	Beregninger af P-værdier	26
3.3	Vacciner	27
3.4	Spredning af IRPC værdier i hver aldersgruppe	29
4	Diskussion	33
5	Konklusion	36
6	Perspektivering	37
7	Referencer	38

1 INDLEDNING

1.1 LITTERATURGENNEMGANG

1.1.1 INTRODUKTION

Rødsyge skyldes smitte med bakterien *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Den er patogen eller kommensal i en lang række vilde dyr, husdyr, fisk og fugle [16]. Den blev første gang isoleret fra svin i 1882 i USA. I 1930'erne sås den første epidemi i svin og de første forsøg på at kontrollere infektionen i USA. Rødsyge hos svin kan være meget tabsvoldende, da infektion kan forårsage septikæmi og dermed pludselige dødsfald blandt slagtesvin. Følgevirkningerne efter en akut infektion kan være polyarthritis og/ eller endocarditis [12]. Rødsyge er en zoonose, som kan give anledning til kutan infektion på hænder eller fingre hos mennesker. Sygdommen er ofte relateret til arbejde på slagterier og i fiskeindustrien. Humant kan infektionen i sjældne tilfælde også være systemisk med samme prædilektions steder som hos svin, nemlig hjerte og led [16].

1.1.2 INDELING I SEROTYPER OG SPA

Genus *Erysipelothrix* er inddelt i 2 arter: *Erysipelothrix rhusiopathiae* og *Erysipelothrix tonsillarum*. Der findes desuden enkelte arter *Erysipelothrix* sp.1-3, som ikke er inkluderet i disse to hovedgrupper. Inden for hver art er der forskellige serotyper. De forskellige stammer kan grupperes i serotyper ved serotyping, som er en precipitations test (se diagnostik). Der er defineret minimum 23 forskellige serotyper [12].

Art	Serotype
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21
<i>Erysipelothrix tonsillarum</i>	3, 7, 10, 14, 20, 22, 23
<i>Erysipelothrix</i> sp.-1	13
<i>Erysipelothrix</i> sp.-2	18, enkelte stammer af 9 og 10
<i>Erysipelothrix</i> sp.-3	Enkelte stammer af 7

Tabel 1: Inddeling af de forskellige bakteriearter i serotyper

Der er forskel på virulensen af de forskellige arter, og det vurderes at 96 % af alle stammer inden for *Erysipelothrix tonsillarum* (ET herefter) er avirulente, mens kun 33 % af stammerne inden for *Erysipelothrix rhusiopathiae* (ER herefter) menes at være avirulente. Der er stor forskel på virulensen af de forskellige ER stammer [16]. I langt de fleste tilfælde af klinisk rødsyge er der fundet serotype 1 og 2 [15].

Erysipelothrix rhusiopathiae producerer flere forskellige enzymer, som er involveret i patogeniteten hos bakterien. Neuraminidase er en af disse enzymer, og der er fundet sammenhæng i mellem mængden af produceret neuraminidase og patogeniteten af den enkelte serotype. Neuraminidase kan spalte sialytsyre, som findes i cellemembranen på overfladen af celler. Et

andet enzym er hyaluronidase, som anses for at være vigtig ved udbredelsen af bakterien i vævet. Dette er dog fundet hos både virulente og avirulente stammer af ER, så derfor er dets rolle som virulens faktor kontroversiel [13]. Kapsel antigener på overfladen af rødsyge bakterier har den effekt at de forhindre fagocytose af leucocytter og dette har ligeledes en betydning for patogeniteten [12].

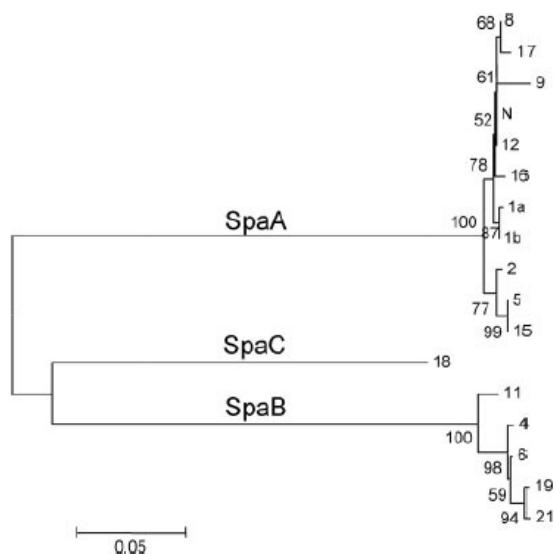
Den seneste forskning i Japan har resulteret i en inddeling af ER, i henhold til forekomsten af overflade proteiner på bakterien kaldet Spa, som er en forkortelse for surface protective antigens. Der er krydsbeskyttelse mellem de forskellige serotyper, og denne beskyttelse kan forstås lettere, hvis man ser på hvilke Spa, der er udtrykt på overfladen af de forskellige serotyper. Spa er inddelt i Spa A, Spa B og Spa C afhængig af deres gensekvens [15].

Spa type	Serotype
Spa A	1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 17
Spa B	4, 6, 11, 19, 21
Spa C	18

Tabel 2: Inddeling af serotyper efter type af Spa på overfladen

Spa proteiners funktion er at beskytte bakterien imod fagocytose. Samtidig udløser disse proteiner specifikke beskyttende antistoffer, som er med til at forklare den krydsbeskyttelse, der er til stede mellem forskellige ER stammer [12]. Der er ikke fundet Spa på overfladen af ET. Dette er med til at bekræfte, at Spa er involveret i patogenesen for ER, da alle serotyper inden for ET er formodet avirulente [15].

Der er blevet undersøgt, hvor stor genetisk lighed der er i mellem Spa inden for samme type ved at sammenligne de forskellige serotyper, som udtrykker den samme Spa. Aminosyresekvensen i Spa A har en lighed på 96-99 % for alle de serotyper, som udtrykker Spa A. Det samme gør sig gældende blandt de serotyper, som udtrykker Spa B. Dog er ligheden i mellem de forskellige Spa typer væsentlig mindre, 61-64 % mellem Spa A og Spa B, 63-65 % mellem Spa A og Spa C samt 66-67 % mellem Spa B og C [15].



Figur 1: Et phylogenetisk træ indeholdende de forskellige Spa typer med tilhørende serotyper[15]

Ovennævnte krydsbeskyttelse er demonstreret ved et forsøg med mus, som blev immuniserede med rekombinant Spa A, B eller C over for en kontrol gruppe. Musene i hver Spa type og kontrolgruppen blev delt i 4 grupper af 10 mus, og hver gruppe blev ”challenged” med hver sin serotype; enten 1a, 2, 6 eller 18. Mortalitetsraten blandt musene blev registreret i 14 dage, og resultatet var som følger:

Mus immuniseret med	Challenged med	Mortalitet i procent
rSpa A	Serotype 1a	0
	Serotype 2	0
	Serotype 6	50
	Serotype 18	30
rSpa B	Serotype 1a	60
	Serotype 2	50
	Serotype 6	0
	Serotype 18	40
rSpa C	Serotype 1a	10
	Serotype 2	10
	Serotype 6	10
	Serotype 18	0
Kontrol	Serotype 1a	100
	Serotype 2	100
	Serotype 6	100
	Serotype 18	100

Tabel 3: Mortalitet i hver gruppe af mus afhængig af immunitet og ”challenge”.

Overlevelsesraten var størst i den gruppe af mus, som var blevet immuniserede med rSpa C, hvor kun 10 % af musene døde efter ”challenge” med heterolog serotype [15].

Tidligere studier konflikter dog med ovenstående fund, da mus vaccineret med en ER serotype 2 stamme havde varierende beskyttelse over for andre serotyper inden for samme Spa A type og fuld beskyttelse overfor heterolog Spa typer [8]. Spa's betydning var dog ikke klarlagt på det tidspunkt. Den seneste forskning fra Kina viser, at Spa A er en vigtig virulens faktor i stamme C43065, som er en serotype 2 stamme isoleret fra flere rødsyge epidemier i landet. Ved at fjerne Spa A og danne en mutant avirulent stamme kunne LD₅₀ reduceres væsentligt [4].

1.1.3 SMITTEVEJE OG SYMPTOMER

Erysipelothrix rhusiopathiae bakterien er ubikvitært forekommende og kan overleve i miljøet i længere tid. Det antages at 30-50 % af alle grise er raske smittebærere, og bakterien findes både i tonsiller og andre lymfoide organer. Grisene kan udskille bakterien både i fæces eller oronasal sekret, og derved smittes andre grise indirekte via fæces i miljøet og direkte ved oral eller nasal kontakt [9,12].

Tre kliniske former af rødsyge er beskrevet; akut, subakut og kronisk. Den akutte form er septikæmisk og symptomerne er akutte dødsfald, aborter, nedstemthed og feber. Dyrene kan have en stiv gang pga. ledsmerter, og der kan ses kraftige røde udslæt på store dele af kroppen. Den subakutte form er ligeledes septikæmisk, men symptomerne er ikke så udtalte. Her kan der 1-3 dage efter infektion ses knuderrosen, som må betegnes som nærmest patogenomisk for infektionen. Det ses karakteriske rhombeformede rødviolette områder i huden. Både den akutte og den subakutte form kan efterfølges af en mere kronisk form. Rødsyge bakterien kan sætte sig i led og hjerte og give anledning til proliferativ polyarthritis med effusion af ledvæske samt valvulær endocarditis [9,12].

Den akutte form med pludselige dødsfald og forandringer af huden kan have stor økonomisk betydning, især for producenter af slagtesvin, da slagtedyret med tegn på knuderrosen bliver totalt kasseret på slagteriet.

Den subakutte form af rødsyge kan også give anledning til infertilitet med et øget antal mummificerede fostre, små kuld og vaginalt flåd enten før eller efter faring [7,12].

Ved en undersøgelse af vaginalt flåd fra søer, der var udsatte pga. infertilitet, blev der ved den bakteriologiske undersøgelse fundet ER. Betydningen af dette fund er der ikke konkluderet på i artiklen [17]. I et andet studie blev nyrer fra 2 store sobesætninger undersøgt på det slagteri som modtog søerne fra hhv. en udendørsbesætning med 1200 søer og en indendørs besætning med 1600 søer. Alle nyrer som indgik i undersøgelse var fra søer, 5-7 læg, og som alle havde anamnese om infertilitet og vaginalt flåd. Søerne blev efter slagting inspiceret og hvis nyrerne ikke kunne godkendes, blev der foretaget en bakteriologisk undersøgelse. I alle nyrerne uanset, om soen kom fra den indendørs eller udendørs besætning, blev der fundet *E. coli* samt *A. suis*. Derudover var der en blandingsflora af grampositive bakterier i 65 % af nyrerne

fra de udendørs søer, men kun i 3 % af de indendørs søer. ER var en del af den grampositive blandingsflora, men der er ikke angivet i hvor mange tilfælde ER blev fundet [1].

En tredje undersøgelse er en case report fra en besætning med 1500 søer. Prævalensen af vaginalt flåd var steget fra 8 til 21 % før faring og fra 15 til 34 % efter faring gennem de sidste 12 måneder. Anterior vaginalt svab blev udtaget fra 21 søer 1- 2 dage før faring og der blev fundet massiv vækst af ER. Der havde ikke været vaccineret mod rødsyge i besætningen i 20 måneder og vaccinationen blev genoptaget. Fire måneder efter opstart blev 17 ud af de 21 søer svabret igen på samme måde, og der var nu ingen vækst af ER. Det konkluderes at ER infektionen formodentlig er en ascenderende urogenital infektion, og at vaccination har nedsat smittepresset i besætningen [7].

Differential diagnoser til akut rødsyge med feber og pludselig dødsfald blandt slagtesvin er *Salmonella cholerasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Hæmophilus parasuis* og *Streptococcus suis*. Hudlæsioner som ligner infektion med rødsyge er porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) og klassisk svinepest [12].

1.1.4 DIAGNOSTIK

ER er fakultativ anaerob bakterie, dvs. at den kan vokse både med og uden ilt. Dyrkning af bakterien fra væv udtaget fra klimagrise eller slagtesvin med tydelige tegn på rødsyge septikæmi er ofte ikke vanskelig på almindelig blodagar. Ved den kutane form kan det være mere vanskeligt pga. risiko for kontaminering af udtagne hudsvabere fra omgivelserne [14]. Ved undersøgelse af kontamineret materiale kan der inden dyrkning bruges et opformerings medie, som øger sensitivitet ved dyrkning signifikant. En undersøgelse demonstrerede ved dyrkning af prøver både fra diagnostiske indsendelser og fund fra slagteriet, at chancen for et positivt isolat blev øget med 75 % ved brug af opformeringsmedie inden dyrkning på agarplader [2]. Denne metode bruges ikke i Danmark [14].

I perioden december 2010 til december 2015 har der været konfirmeret 31 rødsyge-diagnoser på Videncenter for Svineproduktion's laboratoriet i Kjellerup [14].

Serotypning ved agar gel precipitation test blev udført på Veterinærinstituttet, DTU frem til 2008 hvor undersøgelsen blev nedlagt pga. besparelser. Nedenstående er resultatet af de serotypninger der blev foretaget i perioden 1995 til 2008:

<i>E. rhusiopathiae</i> isolater fra SVS/DVI/DFVF/DTU VET i perioden 1995 – medio 2008													
Serotype	1	2	5	7	9	10	11	15	18	19	22	-	Sum
Antal isolater	23	110	6	1	2	3	6	10	1	1	2	10	175
Procent	13,1	62,9	3,4	0,6	1,1	1,7	3,4	5,7	0,6	0,6	1,1	5,7	100

Modificeret efter Sven Erik Jorsal, DTU VET, juli 2008

Figur 2: Serotypning foretaget på DTU.[5]

Serotypning er en dyr og meget arbejdskrævende analyse metode og bliver derfor ikke tilbudt længere som rutine diagnostik i noget europæisk laboratorium [11]. Samtidig kan serotypning

være forbundet med usikkerhed og reproducerbarheden mellem forskellige laboratorier kan være lav [8].

Et bud på en ny metode til at diagnostisk klassificere de forskellige serotyper af ER i Europa kunne være en PCR teknik, der kan anvendes til adskille de forskellige Spa typer. Denne metode kan bruges på både bakteriologiske isolater, væv og hudbiopsier, men bliver pt. kun udbudt i USA på Iowa State University [18].

I Danmark er der udviklet en FISH (Flourescence in situ Hybridization) test på Veterinærinstituttet, DTU, som kan påvise ER bakterier i formalin fikseret væv, men der er ikke mulighed for yderligere klassificering [14].

Serologiske tests for rødsyge kan benyttes til evaluering af vaccination af avlsdyr, men anses for at have begrænset anvendelse ved diagnostik for akut rødsyge [12]. Efter undersøgelse af det europæiske markedet er der kun fundet 2 laboratorier, der begge udbyder et ELISA kit til undersøgelse af antistoffer for rødsyge; Laboratorios Hipra, S.A og Ingenasa, begge firmaer ligger i Spanien.

1.1.5 UDBREDELSE OG VACCINATION

Som det fremgår af figur 2 var det langt overvejende (79 %) serotype 1 og serotype 2 der blev isoleret i kliniske tilfælde af rødsyge i Danmark i perioden 1995-2008. Siden har der ikke været foretaget en systematisk serotypning af de positive isolater. I slutningen af 2014 blev der sendt 8 ER isolater fra Kjellerup til et laboratorium i UK. Resultatet var serotype 1a og 2 og en enkelt ikke typebar[14].

I USA blev der foretaget en undersøgelse i 6 besætninger med gennembrud af rødsyge på trods af vaccination. Der blev isoleret rødsyge fra både væv og omgivelserne. I hver besætning var det altid den samme serotype, der blev påvist på huden af dyrene. Der blev undersøgt 26 dyr og alle var positive for enten 1a, 1b, 2 og 21. Isolater fra omgivelserne var i 3 ud af 6 besætninger mere varieret. I alt blev der undersøgt 142 prøver fra miljøet, og 56 af dem var positive. Der blev påvist 1a, 1b, 2 og 21, men også serotype 6, 9 og 12. Derudover blev der også fundet én serotype 13, og 2 isolater som ikke var typbare. Desuden blev alle isolater fra både dyr og miljøet undersøgt for Spa type. Alle var positive for Spa A bortset fra serotype 13 og de 2 ikke typebar isolater [3].

I en undersøgelse foretaget i Australien i 34 besætninger med gennembrud af rødsyge i vaccinerede besætninger blev der i 15 af disse besætninger fundet 44 isolater af rødsyge. Desuden blev der fundet 20 isolater i 16 besætninger uden kliniske tegn på rødsyge. Endelig indgik der også 14 reference stammer. Analyse metode var RFLP (Restriktions-fragment-længdepolymorfi), en molekylær teknik, som kan anvendes på hel celle DNA. Igen var der fund af serotype 1a, 1b og 2, og der var ikke forskel på de isolater, der blev fundet i besætninger med gennembrud og i besætninger uden gennembrud. Alle isolater var desuden positive for Spa type A [5].

ER er følsom for pencillin, og en behandling på 1-3 dage har god effekt, men er afhængig af hvornår i forløbet behandlingen påbegyndes [9]. Forebyggelse ved vaccination er hyppigt anvendt i alle de svineproducerende lande. Vaccinerne er baseret på serotype 1 og/eller 2 enten som dræbte vacciner, til injektion, eller som svækkede levende vacciner, som kan tilsættes direkte i drikkevand. Varigheden af immunitet er 6 til 12 måneder. Vaccination kan være effektive overfor akut og subakut rødsyge, men effekten er mindre over for de kroniske former af sygdommen, fordi der sker sekvestration af bakterier i led og hjerte [12].

I Danmark bliver der årligt solgt knap 3 millioner doser af rødsyge/parvovirus kombinationsvacciner og 700.000 doser monovalente rødsyge vacciner (Data fra Veterinærmedicinsk Industriforening). Alle vacciner indeholder serotype 2, bortset fra en enkelt rødsyge vaccine som indeholder både serotype 1 og 2. Det formodes, at alle avlsdyr i Danmark vaccineres mod rødsyge ud fra en sammenholdelse af antal solgte vacciner og antal avlsdyr i Danmark.

1.2 BETYDNING

Rødsyge har stor betydning for alle typer af besætninger, men de økonomiske tab forbundet med sygdommen er mest udtalte i slagtesvinebesætninger. Hos producenter af både 7 kg og 30 kg grise er rødsyge/parovirus vaccination af avlsdyr til gængæld en væsentlig udgift. Prisen for rødsyge/parvovirus vaccination, hvis der anvendes en kombinationsvaccine, kan være fra 30-60 kr. pr. årso. Ved gennemgang af alle de seroprofiler, der blev udtaget i vaccinerede besætninger, blev det tydeligt at immuniteten for rødsyge i sobesætningerne kunne være mere varieret end hvad svinedyrlægerne havde forventet.

1.3 RELEVANS

Dette emne anser jeg for at have stor relevans for de praktiserende svinedyrlæger, da vaccination mod rødsyge, som nævnt bliver foretaget i alle sobesætninger, men ofte ikke bliver yderligere diskuteret, medmindre der er mistanke om gennembrud på vaccinationen. Denne undersøgelse kan forhåbentlig give anledning til fornyet diskussion om vaccination mod rødsyge.

2 UNDERSØGELSE

2.1 FORMÅL OG HYPOTESE

2.1.1 FORMÅL

At undersøge resultatet af rødssyge vaccination i sobesætninger målt på seronegative og -positive dyr i de enkelte aldersgrupper.

At undersøge om der er forskel på antallet af seronegative og -positive dyr i grupperne af ikke vaccinerede og vaccinerede dyr, og om der er forskel på de vaccinerede gruppers niveau af antistoffer.

At undersøge om der er forskel på antallet af seronegative og -positive dyr afhængig af hvilke rødssyge vacciner der anvendes.

At undersøge spredningen af antistof niveauet i de enkelte grupper i besætningerne.

2.1.2 HYPOTESER

H₁: Der er forskel mellem andelen af seropositive dyr i grupperne af ikke vaccinerede polte og basisvaccinerede gylte.

Nulhypotese H₀₁ = Der er ikke forskel mellem andelen af seropositive dyr i grupperne af ikke vaccinerede polte og basisvaccinerede gylte.

H₂: Der er forskel mellem andelen af seropositive dyr i grupperne af vaccinerede gylte samt yngre søer og de vaccinerede ældre søer.

Nulhypotese H₀₂ = Der er ikke forskel mellem andelen af seropositive dyr i grupperne af vaccinerede gylte samt yngre søer og de vaccinerede ældre søer.

H₃: Der er forskel mellem andelen af seropositive dyr ved brug af Farrowsure Gold B i forhold til de andre vacciner

Nulhypotese H₀₃ = Der er ikke forskel mellem andelen af seropositive dyr ved brug af Farrowsure Gold B i forhold til de andre vacciner

H₄: Den enkelte besætning har betydning for middelværdien af de serologiske værdier for de enkelte grupper.

Nulhypotese H₀₄ = Den enkelte besætning har ikke betydning for middelværdien af de serologiske værdier for de enkelte grupper.

2.2 POPULATION

2.2.1 STUDIE ENHED

Studie enheden er ikke vaccinerede polte og rødsyge vaccinerede gylte og søer i danske sobesætninger i perioden 4. november 2014 til 21. juli 2015

2.2.2 MÅL POPULATION

Mål populationen er polte enten i karantænestald eller løbeafdeling inden vaccination mod rødsyge samt vaccinerede gylte og søer 10 uger efter inseminering.

2.2.3 STUDIE DESIGN

Dette studie er et observationsstudie – hvori der indgår:

- En tværsnitsundersøgelse (undersøgelse af andelen af seropositive dyr)
- En kohorte undersøgelse (undersøgelse af andelen af seropositive i forhold til alder og anvendt vaccine)

I tværsnitsundersøgelsen indgår polte inden rødsyge vaccination, gylte, som er rødsyge vaccineret 2 gange og er ca. 10 uger henne i drægtigheden og revaccinerede søer ca. 10 uger henne i drægtigheden. Formålet med undersøgelsen er, at bestemme prævalens af seropositive dyr i de forskellige grupper. Ligeledes undersøges andelen af seropositive dyr i forhold til alder og vaccine anvendt. Desuden bliver spredning af de serologiske værdier i de enkelte besætninger undersøgt.

2.3 DATAINDSAMLING

Hipra Danmark tilbød alle svinedyrlæger i Danmark, at udtage en seroprofil i relevante sobesætninger for rødsyge og parvovirus. Hipra Danmark ville gerne have fokus på rødsyge og parvovirus i sobesætninger, som havde oplevet reproduktionsforstyrrelser eller havde tegn på klinisk rødsyge, men disse forudsætninger var ikke et krav for udtagelse af blodprøver i de enkelte besætninger. Der blev udtaget seroprofiler i 43 besætninger, men i denne undersøgelse er der kun medtaget data fra besætninger, hvor der også er udtaget blodprøver fra ikke vaccinerede polte, og dermed blev antallet reduceret til 31. Ved henvendelse til Hipra Danmark blev den pågældende svinedyrlæge spurgt om årsag til udtagelse af blodprøver i besætningen og denne blev noteret.

Uspecifikke reproduktionsforstyrrelser	17 besætninger
Klinisk rødssyge eller mistanke om rødssyge	5 besætninger
Fund af parvovirus i fostre eller mistanke om parvovirus	3 besætninger
Check af vaccinationsmanagement for rødssyge	4 besætninger
Mistanke om rødssyge ledbetændelse	1 besætning
Manglende information	1 besætning

Tabel 4: Svinedyrlægernes årsag til udtagning af seroprofiler

Dette var besætningsdyrlægens vurderinger af besætningen som årsag til udtagning af blodprøver. Der findes i denne undersøgelse ingen data, som kan understøtte deres begrundelser.

Der var 21 forskellige svinedyrlæger som henvendte sig med et forskelligt antal besætninger.

8 sobesætninger	1 dyrlæge
2 sobesætninger	3 dyrlæger
1 sobesætning	17 dyrlæger

Tabel 5: Antal af besætninger som hver besætningsdyrlæge har med i denne undersøgelse.

Ved henvendelsen tilbød Hipra Danmark at udtage blodprøverne. Alternativ kunne dyrlægen vælge selv at udtage blodprøverne i besætningen.

Besætningsdyrlægen	9 sobesætninger
Anne Mette Strunz, Hipra Danmark	17 sobesætninger
Rikke Søgaard, Hipra Danmark	5 sobesætninger

Tabel 6: Fordeling af hvem som har udtaget blodprøverne

Der blev udtaget blodprøver i hver enkelt besætning efter følgende metode:

- 6 stk. ikke vaccinerede polte
- 6 stk. gylte
- 6 stk. 1. og 2. lægs søer som var i deres 2. eller 3. drægtighed
- 6 stk. 3. og 4 lægs søer som var i deres 4. eller 5. drægtighed
- 6 stk. 5 og 6 lægs søer som var i deres 6. eller 7. drægtighed

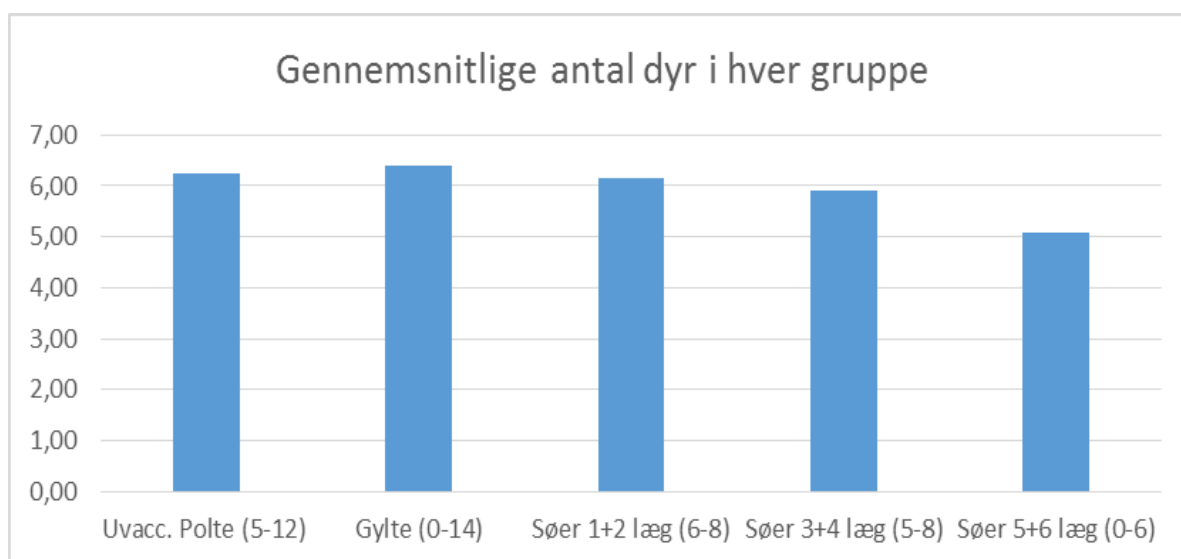
Antallet af læg er defineret som antallet af fødte kuld grise. Det skulle tilstræbes at udtage blodprøverne i slutningen af 2. trimester eller starten af 3. trimester hos de drægtige dyr. Dette tidspunkt er valgt, for at undgå at udtage blodprøverne i den sene del af drægtigheden samt laktationen, da antistoffer overføres fra serum til colostrum. Endvidere vil et fast tidspunkt for udtagning af prøver give et mere sikkert grundlag for sammenligning af prøveresultaterne fra de forskellige besætninger.

Blodprøverne blev udtaget i ustabiliserede blodprøve glas (10 ml) og opbevaret i køleskab efter udtagning. Ca. 24 timer efter var blodet koaguleret, og serum kunne derefter hældes fra i et hønserør (5 ml) og dernæst fryses. Når der var udtaget blodprøver fra 3-5 besætninger, blev prøverne sendt til Diagnos i Spanien, et laboratorium ejet af Laboratorios Hipra, S.A.

Det er normal praksis at alle avlsdyr er basisvaccineret mod rødsyge og parvovirus inden første løbning, og at de dernæst bliver vaccinerede i intervallet 3 uger før hver faring til 3 uger efter hver faring mod rødsyge og evt. parvovirus. Vaccinationsintervallet kan således variere ca. 6 uger fra besætning til besætning. Hvis dette vaccinationsprogram er blevet fulgt i besætningen stammer alle blodprøverne udtaget fra gylte og søer fra vaccinerede dyr. I hver seroprofil indgår polte, som ikke er i basis vaccinerede, således at der er både ikke vaccinerede og vaccinerede dyr i hver seroprofil.

Antallet af dyr i hver gruppe kan variere, og ligeledes kan der mangle blodprøver fra nogle af de ældre søer i enkelte besætninger. I 14 af besætningerne er der udtaget 30 blodprøver fordelt på 6 dyr i hver gruppe. I 9 af besætningerne er alle grupper repræsenteret med 6 ± 1 dyr i 1-2 af grupper. Mens der i de resterende 9 besætninger kan der være grupper som ikke er blodprøvet og/eller antallet af dyr i hver gruppe varierer med mere end ét dyr.

Som det kan ses af grafen nedenfor er det gennemsnitlige antal af dyr i hver gruppe faldende med stigende læg. Dette skyldes, at ældre søer kan være svære at blodprøve pga. størrelse og ofte aggressive adfærd.



Figur 3: Gennemsnitlige antal dyr i hver grupper pr. besætning. Tallet i parentes angiver min. og max. antal dyr

2.4 BESKRIVELSE AF BESÆTNINGER

Det gennemsnitlige antal af søer, gylte og orner i de 31 besætninger er 802 [380-1600] ifølge CHR- registeret. I henhold til en undersøgelse fra 2015 foretaget af Seges i sobesætninger, som anvender AgroSoft eller DLBR SvineIT, er det gennemsnitlige antal af årssøer 707 i 537

danske sobesætninger med i alt 380.000 søer. Der er en forskel i opgørelsen af de forskellige tal, og det må forventes at antal dyr i CHR registeret er højere, da der her også indgår både orner og gylte.

Forskellige typer af sobesætninger indgår i denne undersøgelse, både avl og opformeringsbesætninger, produktionsbesætninger og enkelte besætninger som ikke er med i SPF systemet. Fordelingen ser således ud:

Avl og opformering (røde)	4 sobesætninger
Produktionsbesætninger (blå)	25 sobesætninger
Ukendt/ Konventionel	2 sobesætninger

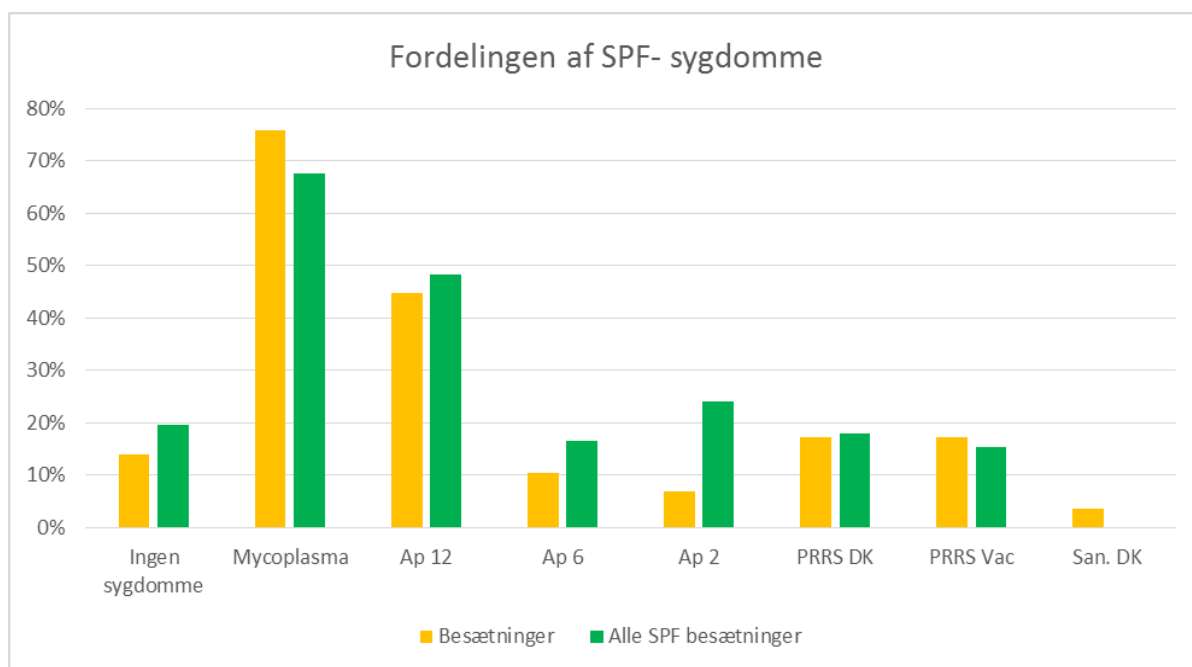
Tabel 7: Inddeling af sobesætninger efter besætningstype.

Der var således 29 besætninger svarende til 97 % af søerne, som havde en SPF status og det er mere end landsgennemsnittet på 70 % ifølge data fra Videncenter for Svineproduktion, 2013. Antallet af SPF sygdomme i de 29 besætninger er registeret således:

SPF sygdom	Antal af besætninger positive
Ingen SPF sygdomme	4
<i>Mycoplasma hyopneumonia</i>	22
<i>Actinobacillus pleuropneumonie type 12</i>	13
<i>Actinobacillus pleuropneumonie type 6</i>	3
<i>Actinobacillus pleuropneumonie type 2</i>	2
PRRS DK	5
PRRS Vac	5
Under sanering for PRRS DK	1

Tabel 8: SPF sygdomme registeret i de enkelte besætninger. Obs: en besætning kan være positiv for mere end 1 SPF sygdom

Fordelingen af disse besætnings SPF- sygdomme sammenholdt med landsgennemsnittet ses i fig. 4. Landsgennemsnittet er beregnet på baggrund af data fra alle 2931 SPF so- og slagte-svinebesætninger opdateret d. 30. sept. 2015.



Figur 4: Sammenligning af den procentvise fordeling af SPF sygdomme i henholdvis sobesætningerne, som indgår i dette studie og alle SPF besætninger i Danmark

Det kan konkluderes, at tilstedeværelse af SPF sygdomme i dette studies 29 SPF sobesætninger, er repræsentative for de SPF sygdomme, som findes i so- og slagtesvinebesætninger registeret i de danske SPF systemet.

2.5 VARIABLER

2.5.1 SEROLOGISK UNDERSØGELSE

Serum fra blodprøverne blev analyseret vha. af en indirekte ELISA CIVTEST SUIS SE/MR. Dette ELISA kit blev udviklet af Laboratorios Hipra, S.A. i 1998. Kittet bliver anvendt på Diagnostos, men sælges også til andre laboratorier.

Der er tale om en indirekte ELISA, og enkelte brønde er coatede med *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Serum bliver fortyndet 1:200 inden påsætning på ELISA pladen. Efter vask tilsættes enzytbundet antistof (sekundær antistof) som binder sig til de bundne antistoffer fra serumprøven. Dernæst vaskes overskydende enzytbundet antistof af pladen, og der tilsættes et substrat, som ved reaktion med enzymet på det sekundære antistof farver brønden, hvis mængden af antistoffer i serum prøven er høj nok. Processen stoppes efter 15 min og pladen aflæses i en ELISA reader.

Der er 2 negative og 2 positive kontroller på hver ELISA plade, og for at resultaterne på en plade er valide, skal middelværdien af de positive kontroller være $> 0,9$, og middelværdien af de positive kontroller divideret med middelværdien af de negative kontroller skal være > 5 .

Resultatet af den enkelte prøve beregnes efter nedenstående formel:

$$\text{IRPC} = \left[\frac{\text{OD}_{405} \text{ Sample} - \text{Mean OD}_{405} \text{ Negative Control}}{\text{Mean OD}_{405} \text{ Positive Control} - \text{Mean OD}_{405} \text{ Negative Control}} \right] \times 100$$

IRPC er relativ index x 100, og en prøve bliver vurderet som negativ hvis aflæste IRPC værdi er ≤ 40 og positiv hvis aflæste IRPC værdi er > 40

Testen har en diagnostisk specificitet på 100%, og ligeledes en diagnostisk sensitivitet på 100%. Beregningerne af begge værdier er opgjort i en intern valideringsrapport fra Laboratorios Hipra, S.A. og denne rapport er konfidentiel.

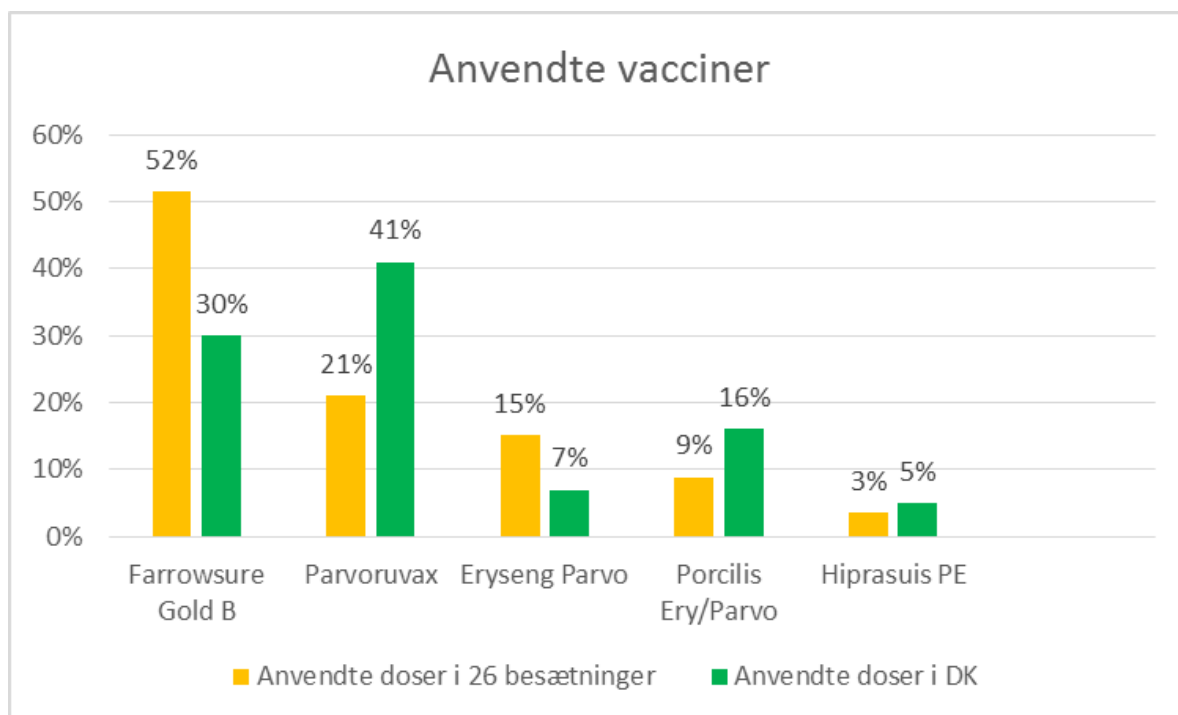
2.5.2 TYPER AF RØDSYGE VACCINER ANVENDT

Der blev anvendt forskellige typer af vacciner i besætningerne. I alle besætningerne blev anvendt en kombinationsvaccine, som beskytter mod klinisk symptomer på både rødsyge og parvovirus. En enkelt vaccine, Farrowsure Gold B, beskytter, ud over rødsyge og parvovirus, også mod reproduktionsproblemer forårsaget af forskellige leptospirose ssp. (Medicintil-dyr.dk). Vaccinen registreret som anvendt i den enkelte besætning i forbindelse med blodprøveudtagningen, skal have været anvendt til avlsdyrene i minimum 6 måneder forud for udtagning af blodprøverne. Da hver so farer gennemsnitligt 2,3 gange pr. år og vaccination sker i forbindelse med faring, vil alle avlsdyr i besætningen dermed være vaccineret minimum 1 gang med den pågældende vaccine inden for en periode af 6 måneder. 26 besætninger havde kun anvendt en slags kombinationsvaccine i hele undersøgelsesperioden, hvor 5 besætninger (3195 søer) havde anvendt en kombination eller skiftet vaccine undervejs i forløbet. Disse 5 besætninger er ikke medtaget i den følgende opgørelse.

For at vurdere hvor vidt fordelingen af de anvendte vacciner i denne undersøgelse var repræsentativ for hele Danmark, blev data fra Vetstat fremskaffet. Vetstat er en database, hvor alle dyrlægers ordinationer af receptpligtig medicin bliver registreret. Ved hjælp af data fra Vetstat i perioden 1. aug 2014 til 1. aug 2015, blev den procentvise fordeling af de anvendte vacciner i besætningerne beregnet. Antallet af søer i de besætninger, som anvendte den pågældende vaccine blev multipliceret med 3, fordi det forventes at vaccineforbruget i en besætning, hvor søer vaccineres enten før eller efter hver faring, og polte vaccineres 2 gange før løbning, er 3 doser pr. årssø. Dette forudsætter en polterrekuttering på 50 % pr. år i besætningen. Ligeledes blev der ud fra data i Vetstat beregnet den procentvise fordeling af ordinerede vacciner i hele Danmark i samme periode. Alle beregninger er samlet i nedenstående tabel 9 og figur 5.

Vaccine	Producent af vaccine	Antal søer i besætningerne	Antal doser anvendt	Procentvis fordeling	Procentvis fordeling i DK (Vetstat)
Farrowsure Gold B	Pzifer	11190	33570	52 %	30 %
Parvoruvax	Merial	4545	13635	21 %	41 %
Eryseng Parvo	Hipra	3270	9810	15 %	7 %
Porcilis Ery/Parvo	MSD	1927	5781	9 %	16 %
Hiprasuis PE	Hipra	750	2250	3 %	5 %

Tabel 9: De forskellige vacciner anvendt i undersøgelse og den procentvise fordeling



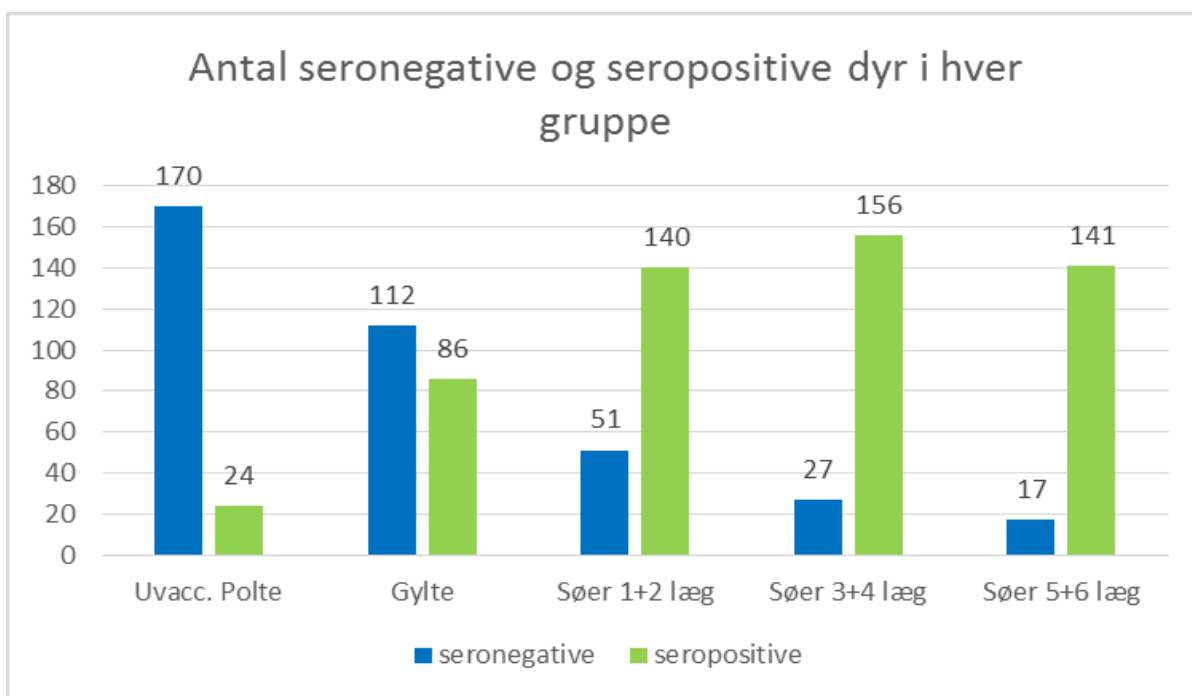
Figur 5: Anvendte vaccine doser i de 26 besætninger forhold til ordinerede doser i DK i perioden 1. nov 2014- 1. aug. 2015

Mere end 50 % af de anvendte vaccine doser i besætningerne, som indgår i denne opgørelse udgøres af Farrowsure Gold B. Dette er ikke repræsentativt i forhold til den andel af vaccine doser der blev ordineret i DK i samme periode.

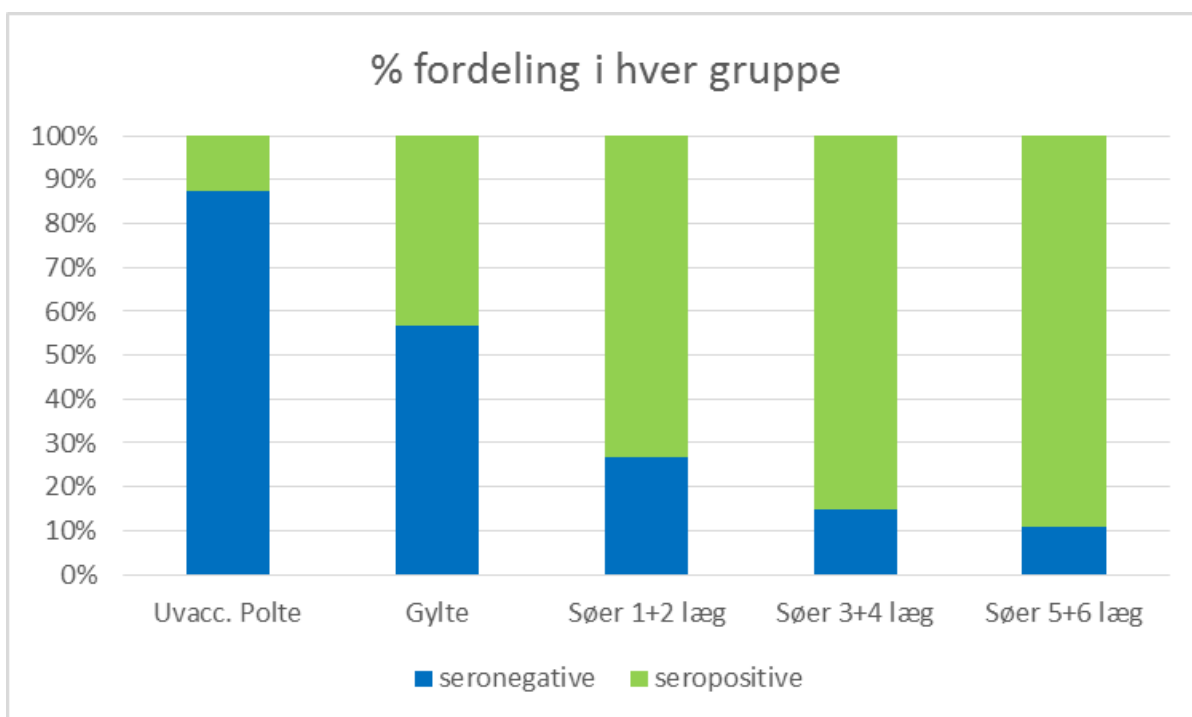
2.6 DESKRIPTIV ANALYSE

2.6.1 FORDELING AF OG SERONEGATIVE OG SEROPOSITIVE DYR

I datamaterialet er analyseret i alt 924 prøver, og nedenfor præsenteres de enkelte grupper på tværs af besætningerne.

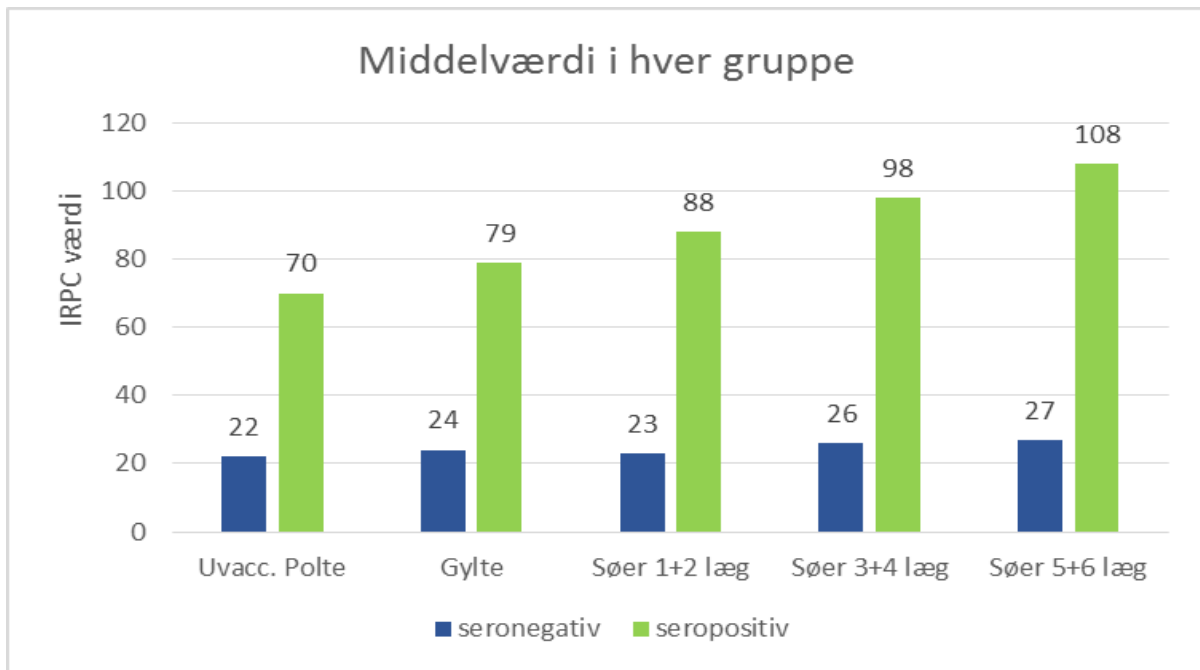


Figur 6: Antal seronegative og -positive dyr i hver gruppe i alle 31 besætninger



Figur 7: Den procentvise fordeling af seronegative og -positive dyr i hver gruppe i alle 31 besætninger

Andelen af seropositive dyr i hver gruppe stiger med alderen på avlsdyrene, så blandt de ældste søer er kun 11% seronegative.

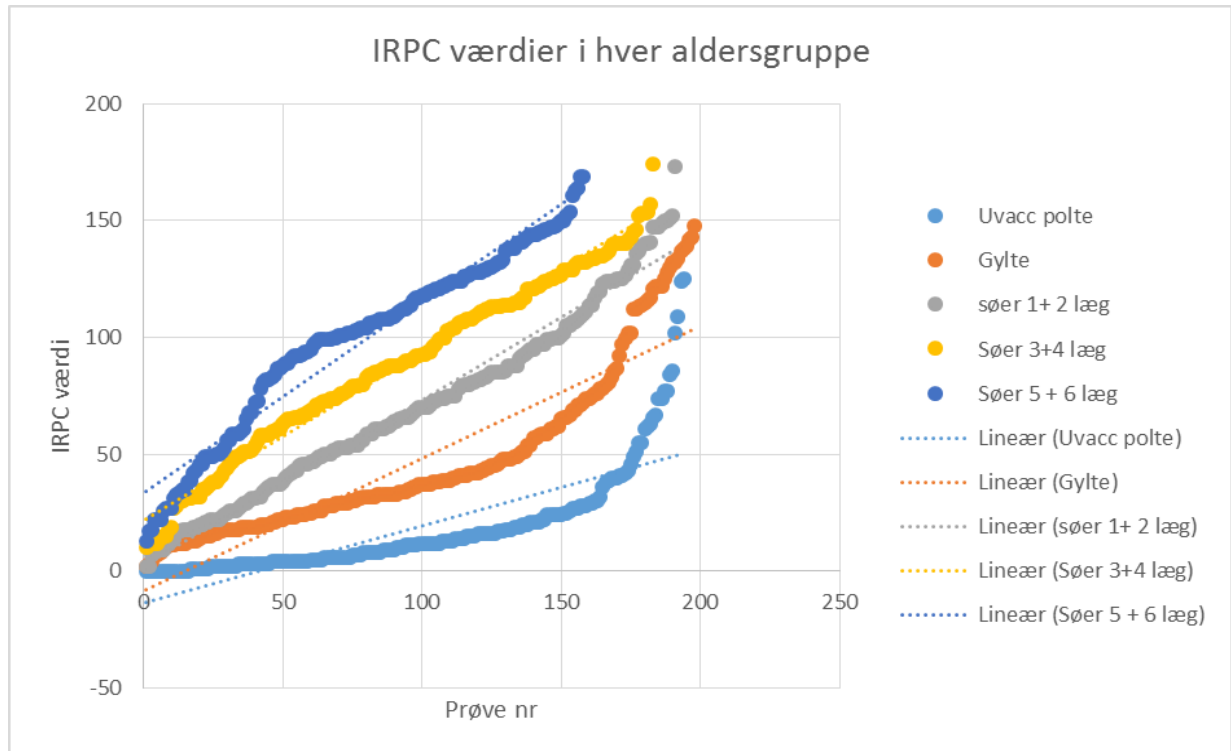


Figur 8: Middelværdi af IRPC værdien i henholdsvis seronegative og -positive gruppe i hver aldersgruppe i alle 31 besætninger

Middelværdierne blandt de seronegative grupper af dyr er næsten ens, mens at middelværdien blandt de seropositive grupper er stigende. Således at der er gennemsnitlig flere antistoffer tilstede i prøverne jo ældre dyrene er.

2.6.2 FORDELING AF DATA I GRUPPERNE

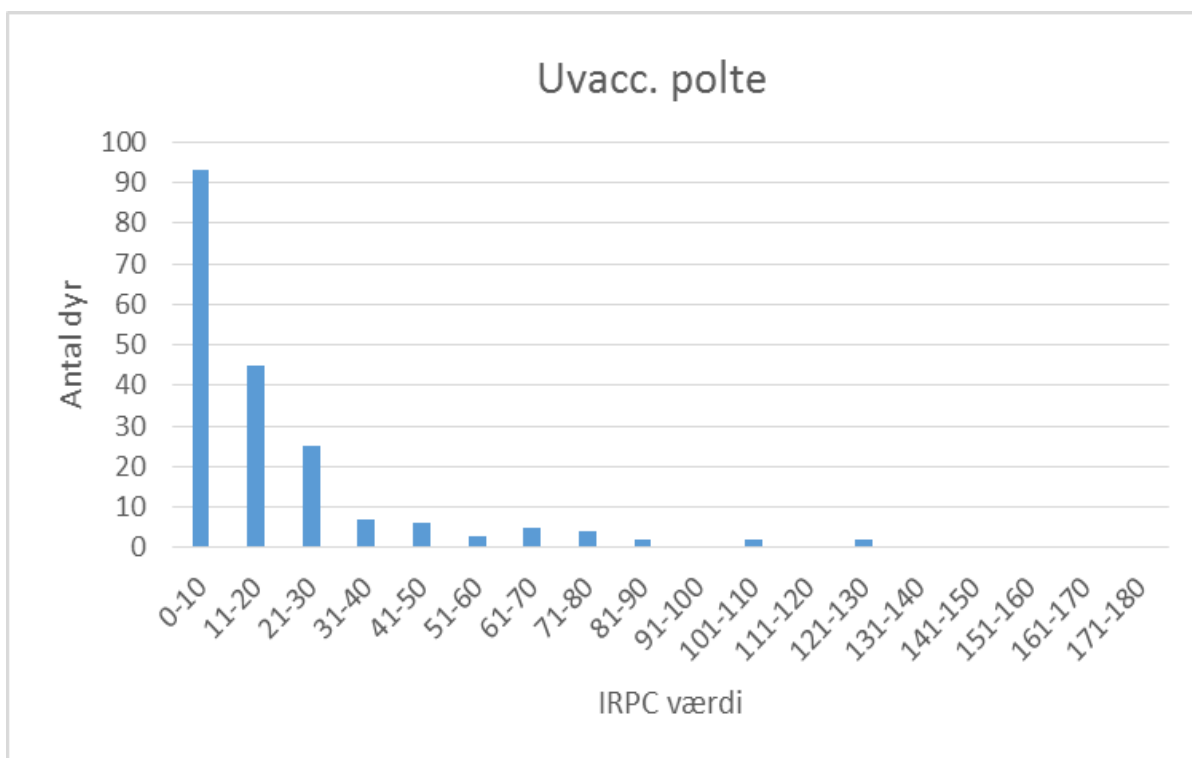
IRPC værdier for hver aldersgruppe blev dernæst på tværs af alle besætninger sorteret efter værdi. Det er illustreret i nedenstående graf:



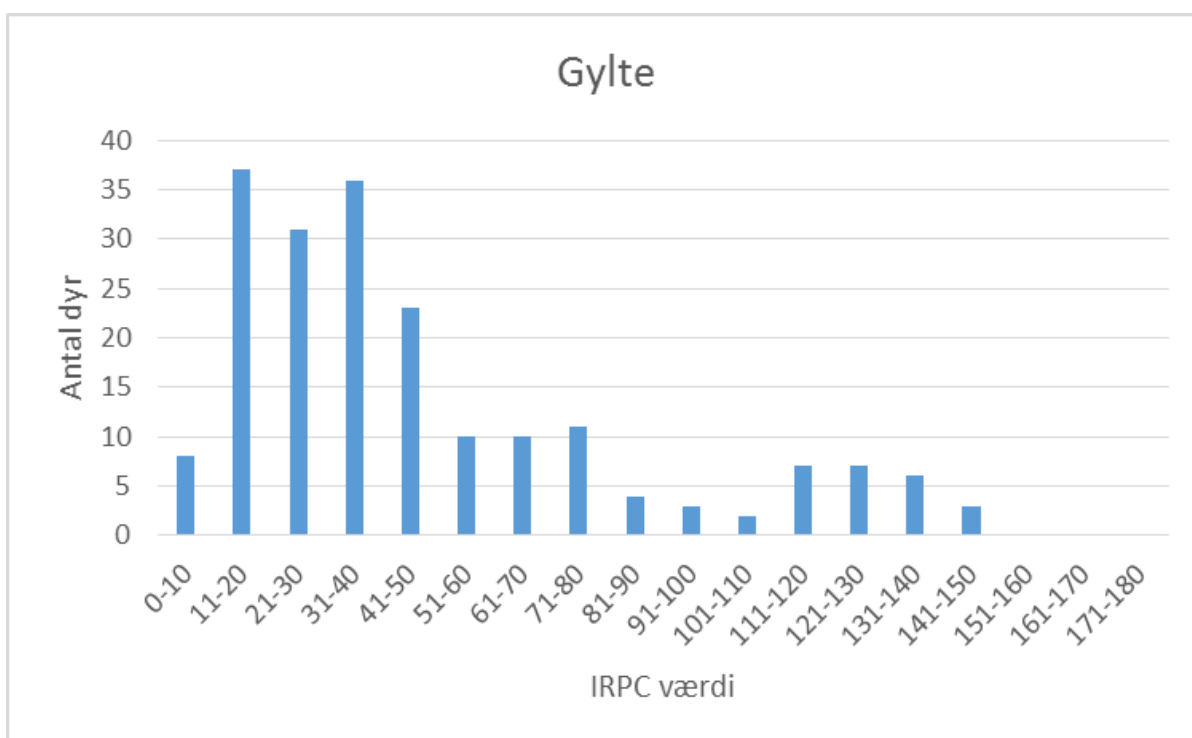
Figur 9. Alle IRPC værdier for alle aldersgrupper. De stiplede linjer er tendenslinjer

Hædningskoefficienten for hver af tendenslinjerne stiger med alderen på dyregrupperne. Det kan forklares med gentagne vaccinationer og øget eksponering for smitte med rødsyge jo ældre dyrene bliver.

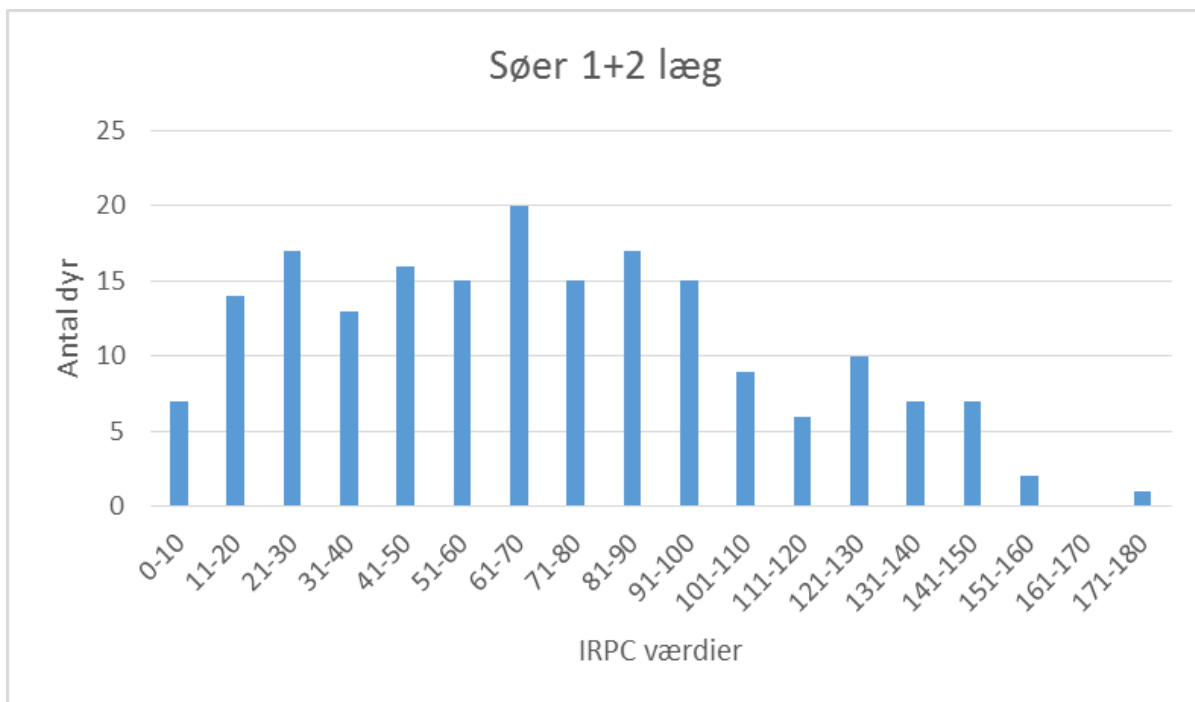
For at vurdere om data i de forskellige grupper er normalfordelt, blev IRPC værdierne i hver gruppe opgjort, i henhold til hvor mange dyr der havde værdi 0-10, 11-20 osv.



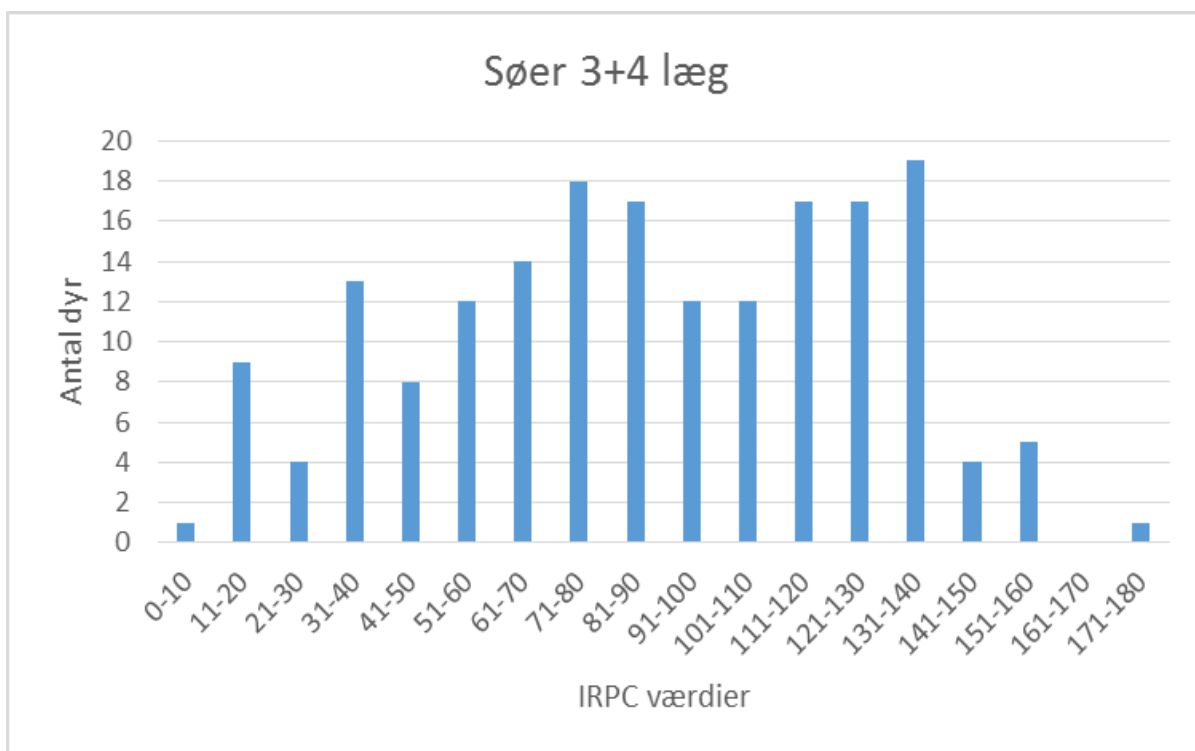
Figur 10: Fordeling af ikke vaccinerede polte i henhold til IRPC- værdi



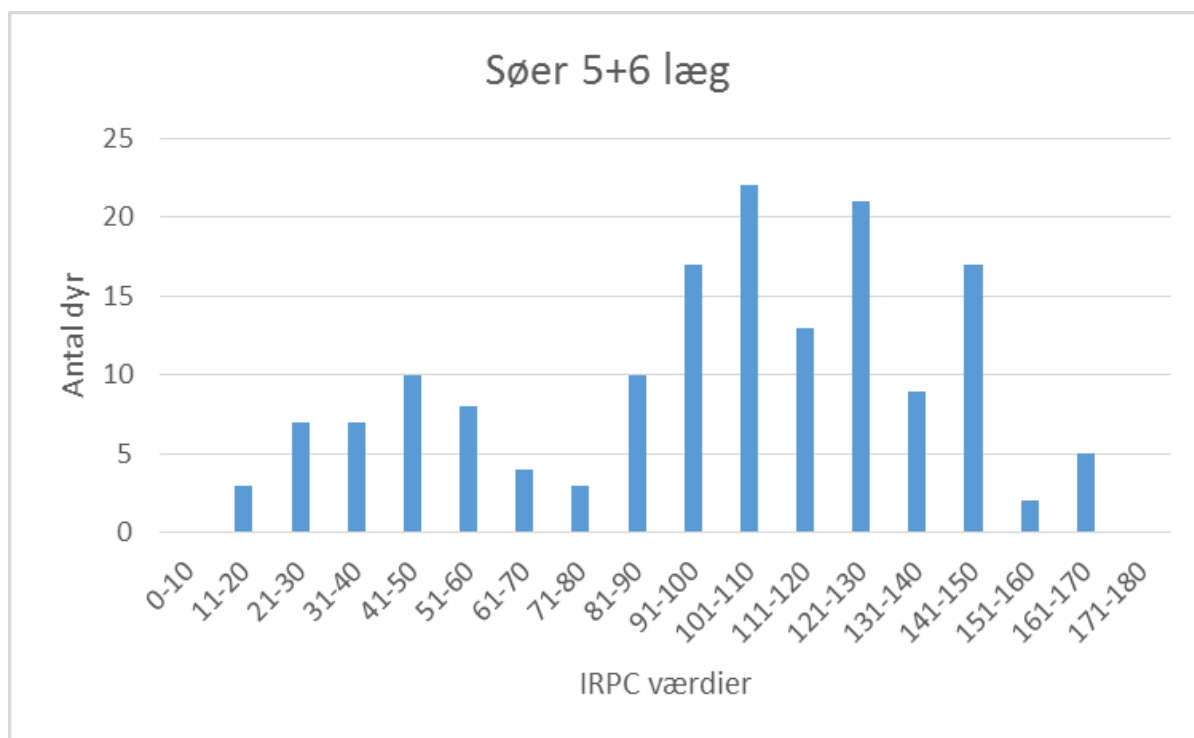
Figur 11: Fordeling af gylte i henhold til IRPC- værdi.



Figur 12: Fordeling af søer 1+2 læg i henhold til IRPC- værdi.



Figur 13: Fordeling af søer 3+4 læg i henhold til IRPC- værdi.



Figur 14: Fordeling af søer 5+6 læg i henhold til IRPC- værdi.

Hvis middelværdi og median for et datasæt har samme værdi, er data formodet normalt fordelt. Dette er kun tilfældet for gruppen af søer 3+ 4 læg, men ved en visuel bedømmelse må det formodes at alle datasæt, undtagen de ikke vaccinerede polte er normalfordelt.

	Uvacc. polte	Gylte	Søer 1+2 læg	Søer 3+4 læg	Søer 5+6 læg
Middelværdi	19	48	70	88	99
Median	11	37	67	88	104

Tabel 10. Beregning af middelværdi og median i hver af grupperne

2.7 DATA BEHANDLING OG ANALYTISK METODE

Alle data er efter indsamling tastet ind i Excel 2013, hvor beregning i den deskriptive del af databehandlingen er udført. Ligeledes er beregning af spredning også foretaget i Excel 2013. Beregninger af p-værdier ved Chi²- test, Mantel- Haenszel og odds ratioer er foretaget ved hjælp af Vasserstats website for statistical computation. Beregninger af p-værdi, for de positive værdier i hver gruppe, i forhold til hinanden, ved Wilcoxon test samt beregning af ANOVA variansanalyse, er foretaget i statistik programmet R.

3 RESULTATER

3.1 PRÆVALENS

Prævalensen af seropositive dyr stiger jo ældre dyrene er.

	Uvacc. polte	Gylte	Søer 1+2 læg	Søer 3+4 læg	Søer 5+6 læg
Prævalens	12 %	43 %	73 %	85 %	89 %

Tabel 11: Den seropositive prævalens i de enkelte grupper.

3.2 BEREGNINGER AF P-VÆRDIER

Dyrene kan inddeles i 2 grupper, seronegative eller – positive. Der er fortaget Chi²- test, for at teste om forskellen mellem antallet af seronegative og - positive dyr i gruppen af ikke vaccinerede polte, er signifikant i forhold til vaccinerede gylte, og om forskellen mellem antallet af seronegative og- positive dyr i gruppen af yngre vaccinerede avlsdyr er signifikant i forhold til de ældre vaccinerede avlsdyr. Forskel på vaccinations status er de forventede værdier, og seronegativ eller - positiv er de observerede værdier.

	Seronegativ	Seropositiv		P – værdi > 0,0001
Gylte	112	86	198	
Uvacc. polte	170	24	194	
	282	110	392	

Tabel 12: Antallet af seronegative og -positive dyr i grupperne af ikke vaccinerede polte og vaccinerede gylte

Der er signifikant forskel på antallet af positive og negative dyr i de 2 grupper.

	Seronegativ	Seropositiv		P- værdi > 0,0001
Søer 3-6 læg	44	297	341	
Gylte + Søer 1-2 læg	163	226	389	
	207	523	730	

Tabel 13: Antallet af seronegative og -positive dyr i grupperne af yngre og ældre vaccinerede søer.

Der er signifikant forskel mellem antallet af seronegative og –positive dyr i de 2 grupper.

Desuden blev der fortaget en Wilcoxon test, som er non-parametrisk test, der kan anvendes på ikke normalt fordelt data. Testen blev udført for at teste om IRPC- værdierne fra de seroposi-

tive vaccinerede dyr i de forskellige grupper var signifikant forskellige. Figur 6. viser, at middelværdien for IRPC- værdien i grupperne af seropositive dyr stiger jo ældre de er. Alle IRPC- værdier på de seropositive vaccinerede dyr blev indsat i programmet for hver gruppe og en p-værdi blev beregnet.

	Antal seropositive dyr	Middelværdi	Median
Gylte	86	79	70
Søer 1+ 2 læg	140	88	83
Søer 3 + 4 læg	156	98	98
Søer 5+ 6 læg	141	108	108

Tabel 14: Median og middelværdi i af de seropositive dyr i hver af grupperne

Gylt versus søer 1-2 læg	P = 0,024
Søer 1-2 læg versus søer 3-4 læg	P = 0,00172
Søer 3-4 læg versus søer 5-6 læg	P = 0,0124
Gylt versus søer 3-4 læg	P = $5,7 \times 10^{-6}$
Gylt versus søer 5-6 læg	P = $5,7 \times 10^{-9}$
Søer 1-2 læg versus søer 5-6 læg	P = $1,8 \times 10^{-7}$

Tabel 15: Beregnet p-værdi for hver sammenligning af 2 grupper

Det kan konkluderes, at der er signifikant forskel mellem IRPC værdier i de forskellige grupper af seropositive vaccineret dyr, når de enkelte grupper sammenlignes, og at forskellen bliver mere signifikant jo mere grupperne adskiller sig mht. alder.

3.3 VACCINER

Ved at se på brugen af de forskellige vacciner i besætningerne i forhold til anvendte doser i hele Danmark i samme periode er der 2 vacciner som skiller sig ud, nemlig Farrowsure Gold B og Parvoruvax. Der er en større andel af avlsdyr som er vaccineret med Farrowsure (52 %) i denne undersøgelse sammenlignet med landsgennemsnittet i samme periode (30 %). Omvendt er der færre dyr i denne undersøgelse, som der er vaccineret med Parvoruvax (21 %) sammenlignet med landsgennemsnittet (41 %).

Da der kun var få besætninger som anvendte Parvoruvax i denne undersøgelse, er det besluttet af at samle besætninger som anvendte andre vacciner ((Parvoruvax, Porcilis Ery/Parvo, Eryseng Parvo og Hiprasuis PE) i en gruppe, og i alt er antallet af dyr vaccineret med disse vacciner er 276. Antallet af dyr vaccineret med Farrowsure er 318.

For at undersøge om der er en forøget risiko for at være seronegativ, og dermed ikke beskyttet efter vaccination med Farrowsure, i forhold til efter vaccination med andre vacciner, blev der foretaget en Chi²- test.

	Seronegativ	Seropositiv		P-værdi=0,215
Farrowsure vaccine	89	229	318	
Andre vacciner	64	212	276	
	153	441	594	

Tabel 16: Antallet af seronegative og -positive dyr i grupperne afhængig af vaccinevalg

Det formodes at alder og dermed gentagne vaccinationer samt eksponeringstid i besætningen, er en confounder. Derfor blev der også foretaget en Mantel- Haenszel- test, hvor der blev beregnet en relativ risiko for hver gruppe.

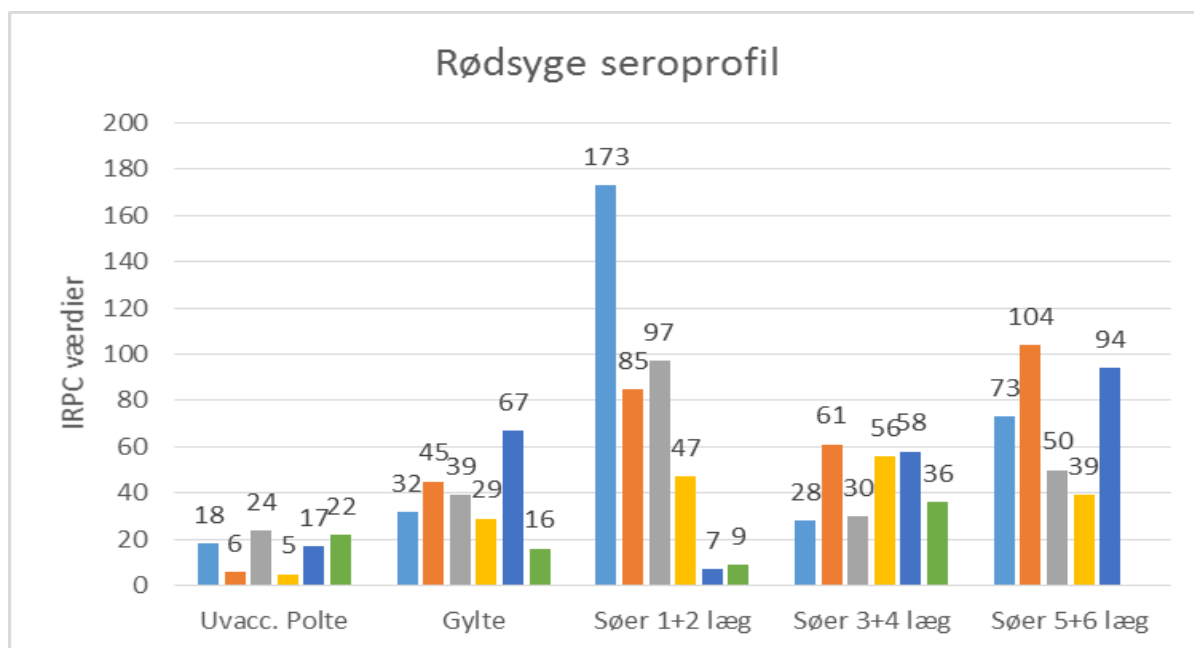
Gylte	Seronegativ	Seropositiv	
Farrowsure vaccine	49	34	RR1= 1,066
Andre vacciner	41	33	
Søer 1 + 2 læg			RR2= 1,492
Farrowsure vaccine	24	61	
Andre vacciner	14	60	
Søer 3 + 4 læg			RR3= 0,789
Farrowsure vaccine	8	72	
Andre vacciner	9	62	
Søer 5 + 6 læg			RR4= NA
Farrowsure vaccine	8	62	
Andre vacciner	0	57	
Samlet	P- værdi= 0,130		

Tabel 17: Beregning af relativ risiko i de forskellige grupper

P- værdien der ikke stratificere er 0,215, men når p-værdien beregnes på baggrund af stratificering bliver den 0,130. Der er derfor ikke signifikant forskel på, om dyrene forbliver seronegative, når man anvender Farrowsure i forhold til de andre vacciner.

3.4 SPREDNING AF IRPC VÆRDIER I HVER ALDERSGRUPPE

Ved gennemgang af data blev det tydeligt, at resultatet af seroprofilerne udtaget i besætningerne, var meget forskellige fra besætning til besætning. Der kunne være stor forskel på IRPC værdierne i den samme aldersgruppe af dyr i den samme besætning. Se nedenstående eksempel:



Figur 15: Seroprofil fra besætning nr. 3. Hver søjle repræsenterer den serologiske værdi for et dyr

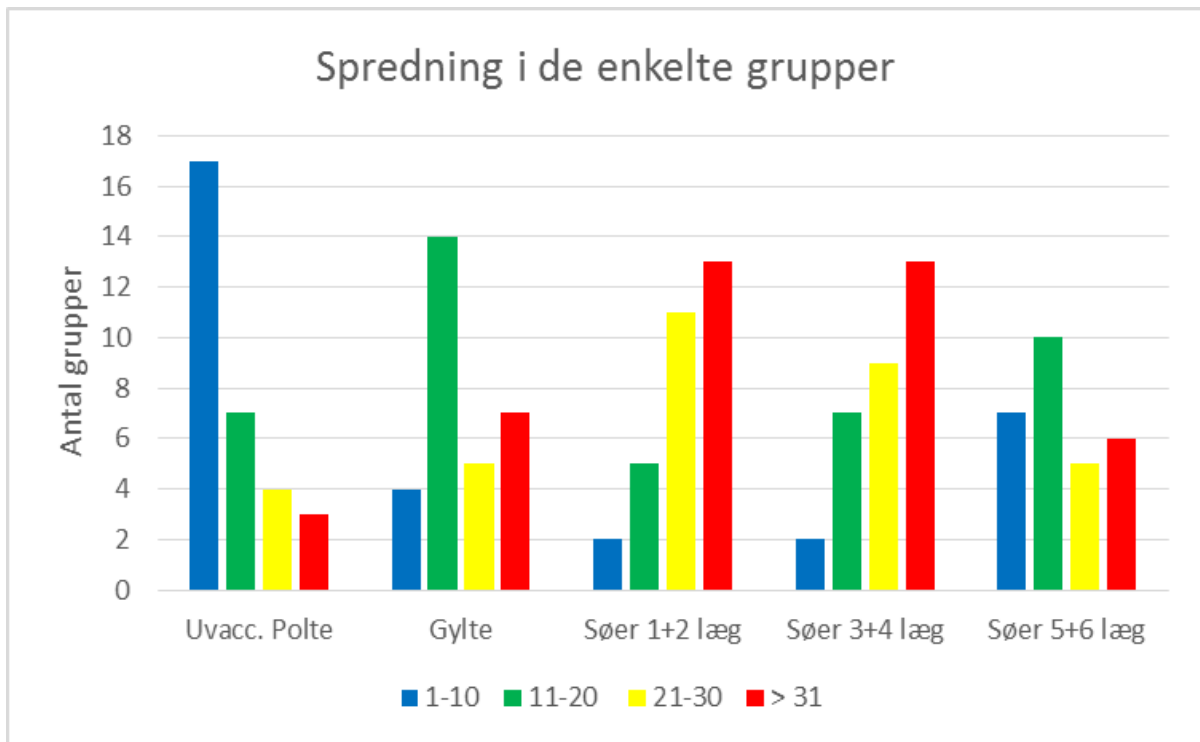
Dette er et eksempel på en rødsyge profil i en besætning, hvor dyrlægen havde mistanke om reproduktionsproblemer, og derfor gerne ville udelukke parvovirus eller rødsyge som årsag. Som det fremgår af fig. 15 er der stor forskel på IRPC værdierne i gruppen af søer 1+2 læg. Der er dyr med høje IRPC værdier, som kan indikere smitte med rødsyge bakterie, og dyr, som trods gentagende vaccinationer, stadigvæk er seronegative. Disse dyr formodes, at være ubeskyttede eller kun delvis beskyttede, hvis niveauet af antistoffer er lavt.

Da seroprofilerne i de enkelte besætninger var meget forskellige, blev spredningen beregnet i hver gruppe, trods et lille antal værdier i hver beregning. De beregnede værdier for spredning er i intervallet mellem 1-57 og middelværdien er 22 og medianen er 21. Værdierne for spredningen blev dernæst fordelt i 4 grupper med værdier 1-10, 11-20, 21-30 og > 31, dvs. 2 gruppe på hver side af medianen.

Besætning nr.	Uvacc. polte	Gylte	Søer 1+2 læg	Søer 3+4 læg	Søer 5+6 læg
1	16	19	27	30	
3	7	16	57	14	25
4	8	22	30	43	33
5	13	9	30	24	11
8	1	33	24	41	
11	6	18	25	24	18
12	3	24	30	24	18
15	5	36	40	47	10
16	7	20	31	31	40
17	21	25	6	32	17
19	43	40	22	41	16
20	28	19	20	21	24
22	10	16	9	19	21
23	13	38	35	25	18
24	23	15	19	15	8
25	7	15	28	22	21
27	9	15	36	43	8
30	13	20	14	22	9
31	7	20	31	31	40
32	35	22	27	22	32
33	17	6	33	38	11
34	11	15	23	8	12
35	33	18	32	25	
36	5	40	24	11	3
38	25	42	36	22	33
39	9	29	22	15	8
41	5	8	27	34	18
42	10	7	19	9	37
43	10		14	14	27
46	13	20	38	32	10
48	7	40	29	15	18
	Median	21			
	1-10	11-20	21-30	> 31	

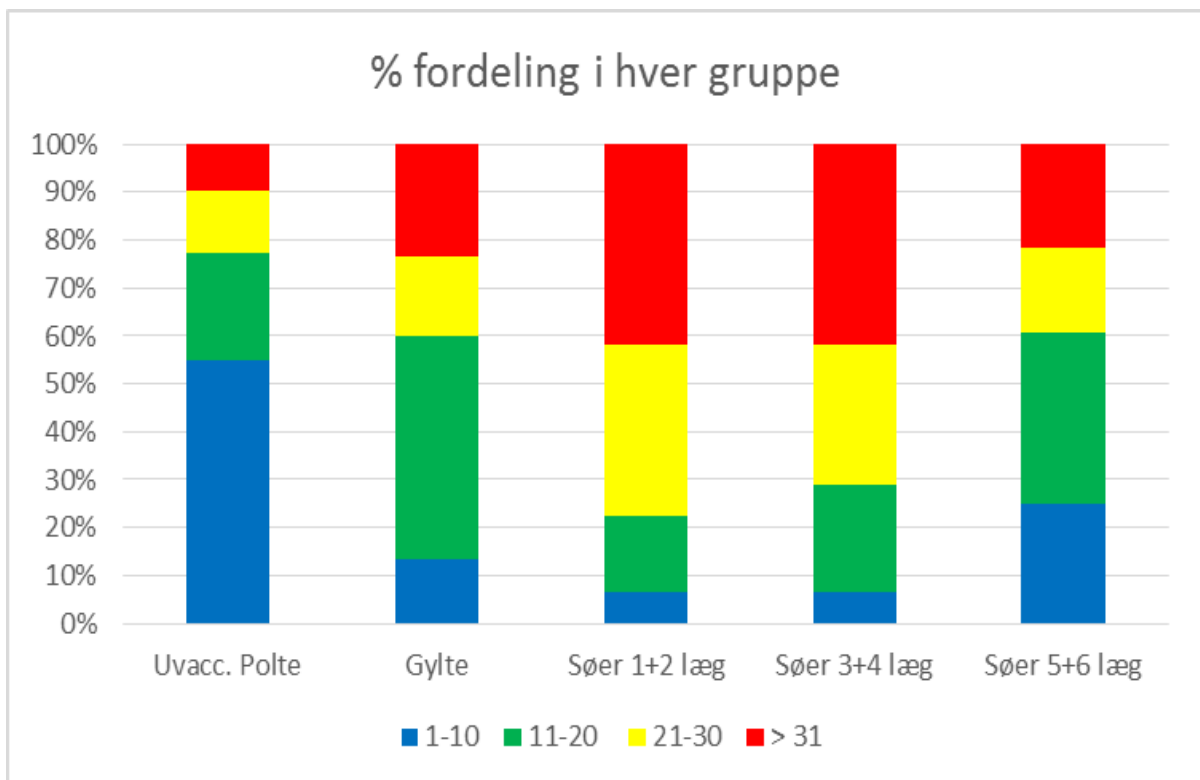
Tabel 18. Beregning af spredningen i hver besætning og hver gruppe i besætningen. Værdi 1-10 markeret med blå, værdi 11-20 markeret med grøn, værdi 21-30 markeret med gul og værdi > 31 markeret med rød. En hvid rubrik markerer, at der ikke er udtaget dyr i den aldersgruppe i den pågældende besætningsprofil.

Dernæst blev der beregnet, hvor mange gange de forskellige grupperinger af spredning var repræsenteret i de enkelte aldersgrupper, på tværs af besætningerne, for at vurdere om der var forskel på aldersgrupperne.



Figur 16: Antal af de forskellige grupperinger af spredning inden for hver aldersgruppe

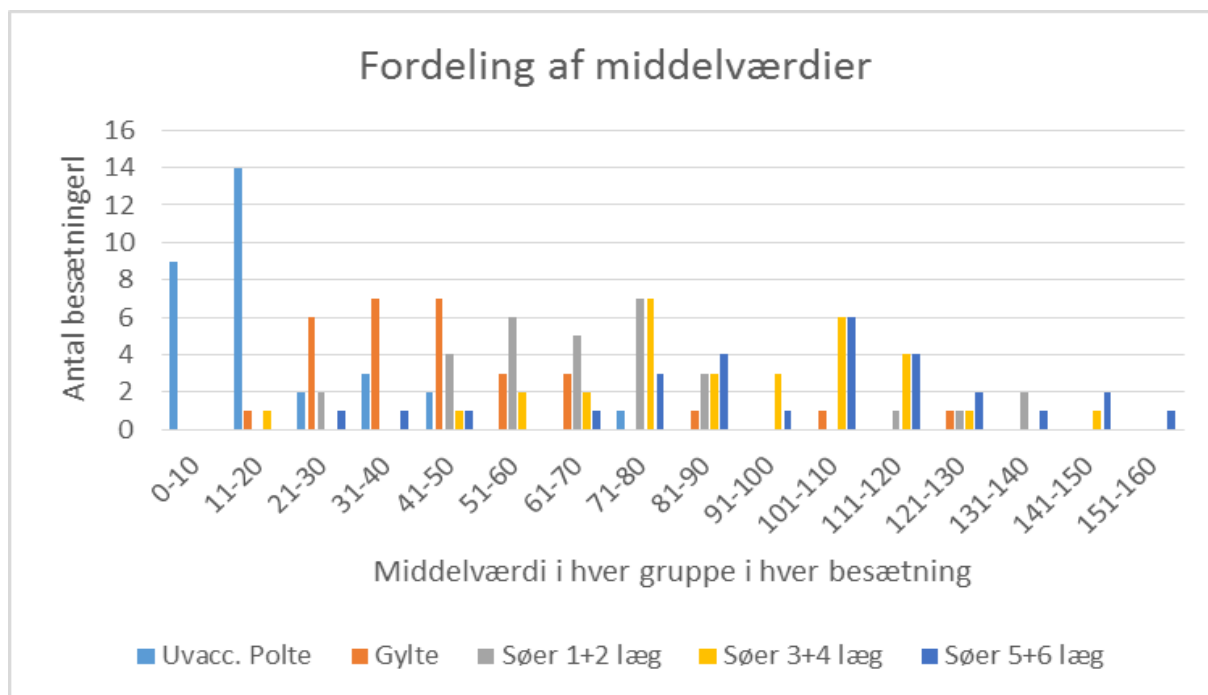
Den procentvise fordeling:



Figur 17: Den procentvise fordeling af gruppering af spredning inden for hver aldersgruppe.

Det ses tydeligt at der i gruppen af søer fra 1 til 4 læg er henholdsvis 77 % af besætningerne og 71 % af besætningerne, som har en spredning, der er større end medianen.

For at teste om den enkelte besætning havde betydning for den serologiske værdi i hver gruppe i hver besætning, blev middelværdien for serologiske værdier i hver aldersgruppe i hver besætning beregnet. Fordelingen af værdier ses nedenfor:



Figur 18: Fordeling af middelværdier for IRPC- værdierne i hver aldersgruppe

	Uvacc. polte	Gylte	Søer 1+2 læg	Søer 3+4 læg	Søer 5+6 læg
Middelværdi	19	46	70	88	99
Median	14	42	70	86	101

Tabel 19. Beregning af middelværdi og median af alle de beregnede middelværdier i hver aldersgruppe.

For at anvende en ANOVA variansanalyse skal data være normalt fordelt, men denne analyse metode er ikke så følsom over for krav om normalfordeling, og ofte er en visuel vurdering tilstrækkeligt. Det konkluderes ved vurdering af figur 18 og tal i tabel 19, at data formodes at være normalt fordelt. Alle IRPC- værdier for hver gruppe fra hver besætning blev lagt ind i programmet, og F-værdien for de enkelte grupper var signifikante i hver besætning.

Det kan derfor konkluderes, at besætning som variable har en indflydelse på middelværdierne af IRPC-værdierne inden for de forskellige aldersgrupper, og dette kan være med til at forklare den store variation i de beregnede værdier for spredningen i hver besætning, men også besætningerne imellem.

4 DISKUSSION

Årsag til udtagning af seroprofilerne i besætningerne var ofte reproduktionsproblemer, men som tidligere nævnt var der ingen data fra besætningerne eller dyrlægerne som kunne bekræfte antagelserne og derfor er de ikke yderligere anvendt i denne opgave. Der er en dyrlæge som har en del besætninger med i denne undersøgelse og hensigten var også at starte et projekt op vedr. reproduktion med denne dyrlæge. Der skulle kun udtages seroprofiler i besætninger som opfyldte nogle fastlagte kriterier, men det måtte opgives, da det blev for tidskrævende.

Anvendte ELISA test kit, som er udviklet af Laboratorios Hipra, S.A, har en diagnostisk sensitivitet og specificitet på 100 %. Der findes et andet rødsyge ELISA test kit på markedet udviklet af Ingenasa. Begge er indirekte ELISA tests. Der er i 2015 foretaget sammenlignende undersøgelser mellem disse 2 ELISA test på baggrund af 277 serum. Prøverne var fra svin vaccineret med forskellige rødsyge vacciner, kendt negative prøver og prøver fra forskellige besætningstyper. Den beregnede Kappa koefficienten var 0,97, hvilket er udtryk for næsten perfekt overensstemmelse, og korrelationskoefficienten (ρ) var 0,86 [10]. Det kan derfor konkluderes, ud fra denne sammenlignede undersøgelse, at datamaterialet i nærværende opgave er uafhængigt af hvilken indirekte ELISA test der er anvendt.

Det er ikke muligt, med den anvendte ELISA test, at skelne mellem antistoffer dannet ved vaccination og antistoffer dannet ved naturlig smitte. Det er antaget at målte IRPC værdier mellem 40-110 i et vaccineret dyr tyder på serokonvertering efter vaccination, og at dyret er beskyttet mod kliniske symptomer på rødsyge. Desuden antages det, at IRPC værdier som overstiger 110 tyder på naturlig smitte, og eventuelle antistoffer dannet ved vaccination bliver boostet. Disse antagelser anvendes ofte ved tolkning af seroprofiler, men de er ikke dokumenterede, og de er derfor ikke anvendt i denne undersøgelse.

I dette studie er prævalensen af seropositive dyr stigende ved stigende alder af avlsdyrene. Det er forventeligt, at andelen af seropositive dyr ville stige, da søerne havde modtaget gentagende vaccinationer. Polte er blevet vaccineret 2 gange inden første løbning, og dernæst er søerne vaccineret før eller efter hver faring. Samtidig vil avlsdyrene formodentlig være eksponeret for naturlig smitte, da undersøgelser viser at 30-50 % af grisene er smittede og dermed også udskiller rødsyge bakterier, som kan overleve længe i miljøet. Alle de anvendte vacciner i denne undersøgelse har dokumenteret varighed af immunitet ved rødsyge vaccination på 6 mdr., og det er forventet at alle søerne er revaccineret 2,3 gange årligt, i henhold til antallet af faringer hos den enkelte so.

Der er flere seronegative gylte end seropositive gylte, og dette er ikke forventeligt efter en basisvaccination og samtidig mulig eksponering for naturlig smitte. Der er dog signifikant forskellen mellem andelen af seropositive gylte og andelen af seropositive ikke vaccinerede polte. I gruppen af de ældste søer er der stadigvæk 11 % af dyrene, som er seronegative efter minimum 6 vaccinationer og længere tids eksponering for naturlig smitte i besætningen. For-

skellen mellem andelen af seropositive dyr i gruppen af ældre avlsdyr er dog signifikant højere i forhold til andelen af seropositive dyr i gruppen af yngre avlsdyr. Der er stor forskel på p-værdier, når IRPC værdien på de seropositive dyr i de forskellige grupper af vaccinerede sammenlignes, og alle værdier er signifikante. P-værdien stiger når grupper med den største aldersforskel sammenlignes, og det er forventeligt.

Ikke vaccinerede polte, der er seropositive, må anses som et udtryk for den naturlige smitte i besætningerne, men eksponeringstiden er ganske kort, da de basisvaccineres inden første løbning. For at få et indtryk af den naturlige smitte i besætningerne skulle der have været en gruppe af ikke vaccinerede dyr i samme aldersgrupper som de vaccinerede, der kunne blodprøves. Dette er ikke muligt, da alle avlsdyr vaccineres, og datamaterialet til denne undersøgelse er fra danske produktive sobesætninger.

Vaccinerede dyr, som er seronegative, må betegnes som risikodyr i besætningen. De forventes at være delvis ubeskyttede og i fare for at blive smittet med den naturlige rødsyge, som formodes at være til stede i besætningen. Infektionen kan være subklinisk, men der er også risiko for akut udbrud af rødsyge med høj feber og hudlæsioner. Ved gennemgang af alle seroprofilerne blev det tydeligt, at der var besætninger, hvor variationen på aflæste IRPC værdierne i enkelte aldersgrupper var stor, dvs. dyr som var seronegative, og dyr med IRPC værdier over 110 i samme aldersgruppe. Dette må betegnes som en serologisk heterolog gruppe. Derfor blev spredningen beregnet i alle aldersgrupper i alle besætninger. En høj værdi på spredningen kunne være udtryk for en stor spredning i den pågældende aldersgruppe.

Ved at sammenholde den beregnede værdi for spredningen i hver aldersgruppe, på tværs af besætningerne, blev det tydeligt, at søer 1.-4. læg adskilte sig fra de andre grupper. En mulig forklaring kan være, at de fleste søer efter 1. læg ofte bliver placeret i store dynamiske grupper, ca. 4 uger efter løbning, med risiko for stress og mulig immunosuppression. Samtidig kan det være vanskeligt at vaccinere løsgående søer, hvis de bliver vaccineret før faring. En mulig årsag til, at den beregnede værdi for spredningen igen blev formindsket efter 4 læg, kan være yderligere vaccinationer og længere tids eksponering for naturlig smitte. Ud fra disse beregninger kan man ikke konkludere, om dyrene så er beskyttede eller ej. En lille værdi af spredning kan være beregnet på kun seronegative dyr, eller dyr, som er seropositive med høje IRPC værdier.

Alle IRPC værdier i hver aldersgruppen blev testet i en ANOVA varians analyse, og konklusionen af den undersøgelse var, at den enkelte besætning som variabel havde betydning. Der er mange faktorer i besætningerne, som har indflydelse på de aflæste IRPC værdier hos det enkelte dyr. Opstaldning og miljø, det immunologiske respons, tidspunkt for vaccination i forhold til udtagning af blodprøver, vaccinations management og valg af vaccine.

Ved gennemgang af hvilke rødsyge/parvovirus vacciner der var anvendt i de forskellige besætninger fremgik det, at vaccinerne anvendt i de 31 besætninger ikke repræsenterede det aktuelle rødsyge/parvo vaccine forbrug i DK. Der var en enkelt vaccine, som var overrepræsenteret

teret, Farrowsure Gold B, men ved den statistiske analyse blev der ikke fundet signifikant forskel mellem andelen af seropositive dyr i besætninger, som var vaccineret med Farrowsure Gold B, i forhold til vaccination med andre vacciner. Denne rødsyge/ parvovirus kombinationsvaccine er, til forskel fra de andre, også registreret til beskyttelse mod kliniske symptomer på leptospirose, men er nu udgået fra det danske marked. Farrowsure Gold B blev ofte anvendt i besætninger med reproduktionsforstyrrelser. Som tidligere nævnt ville Hipra Danmark ville gerne have fokus på rødsyge og parvovirus i sobesætninger, som havde oplevet reproduktionsforstyrrelser, og dette kan være en af årsagerne til, at i denne undersøgelse er Farrowsure Gold B den anvendte vaccine i 52 % af søerne, til forskel fra kun en andel på 30 % ordinerede rødsyge/parvovirus vacciner i hele Danmark. Der er kun foretaget beregninger på denne ene vaccine, da antallet af vaccinerede søer i de andre vaccine grupper blev anset for at være utilstrækkeligt.

Ved en af litteratursøgningerne blev søgeord vedr. rødsyge, reproduktion og svin anvendt, men der var kun 1 artikel som beskrev en direkte sammenhæng og 2 artikler som beskrev en mulig sammenhæng mellem *Erysipelothrix rhusiopathiae* og reproduktionsforstyrrelse.

I Diseases of Swine fra 2012 er det beskrevet at rødsyge kan give anledning til infertilitet og vaginalt flåd. Ved kontakt til den ene af forfatterne, Tanja Opriessnig, professor på Iowa State University, blev dette bekræftet. Det er hendes erfaring at rødsyge kan betragtes som en differential diagnose til leptospirose med symptomer som infertilitet og vaginal flåd som eneste symptomer.

5 KONKLUSION

Formålet med dette studie var, at undersøge forskellige rødsyge seroprofiler fra vaccinerede sobesætninger. Undersøgelsen har resulteret i følgende konklusioner:

1. Andelen af seropositive dyr stiger med antal vaccinationer og med stigende eksponeringstid for smitte med den naturligt forekommende rødsyge bakterie.
2. Der er signifikant forskel mellem andelen af seropositive dyr i de forskellige aldersgrupper, og denne forskel er afhængig af aldersforskellen mellem de grupper der sammenlignes.
3. Der er ikke signifikant forskel i antallet af seropositive dyr i de enkelte aldersgrupper ved anvendelse af vaccinen Farrowsure Gold B i forhold til anvendelse af de andre vacciner.
4. De aflæste IRPC-værdier i de enkelte aldersgrupper er ikke uafhængige af besætningen.
5. Der er en større spredning af IRPC-værdier i gruppen af søer 1.-4. læg.

Desuden fremgik det, ganske overraskende, i denne undersøgelse, at andelen af seronegative dyr blandt de vaccinerede dyr var relativ høj, og selv blandt de ældste søer var der stadigvæk dyr som var seronegative, trods adskillige vaccinationer og flere års eksponering for smitte med rødsyge bakterier. Dette er nyttig og relevant viden for de rådgivende dyrlæger i sobesætningerne. Vaccination af avlsdyr mod rødsyge og parvovirus bliver anset som en forsikringsvaccination og bliver benyttet i alle sobesætninger i Danmark. Men er de enkelte dyr så tilstrækkeligt beskyttede trods vaccination? I de fleste besætninger er svaret sandsynligvis ja, for ellers ville der være mere fokus på rødsyge i besætningerne. Men hvis besætninger oplever gennembrud af rødsyge, ville udtagning af en seroprofil for rødsyge være en god indikator for besætningens status mht. vaccination og naturlig smitte i besætningen.

6 PERSPEKTIVERING

Dette datasæt kunne anvendes yderligere til undersøgelse af forskellige faktorer som gør sig gældende i besætningerne. Følgende spørgsmål kunne evt. besvares.

1. Er aflæste IRPC- værdier afhængige af vaccination før eller efter faring ?
2. Er aflæste IRPC værdier på ikke vaccinerede polte afhængige af om poltene er blodprøvede i sobesætningen eller i tilhørende karantænestald ?
3. Hvilke faktorer gør sig gældende i de besætninger, som har en stor spredning i de enkelte aldersgrupper ?

Rødsyge seroprofiler benyttes til evaluering af vaccination af avlsdyr. Dette er ganske relevant ved kliniske symptomer, eller ved mistanke om subklinisk rødsyge i besætninger som vaccinerer. Det er et enkelt og nemt værktøj, og ved at udtage alle seroprofiler efter samme anvisning, bliver vores kendskab til og mulighed for tolkninger af resultater formentlig forbedret jo flere seroprofiler der udtages og analyseres.

Hipra Danmark har desuden erfaret, at disse seroprofiler er blevet anvendt af dyrlæger, som havde mistanke om utilstrækkelig rødsyge vaccination i deres besætninger. Der er i flere tilfældet fundet fejl i vaccinations management på baggrund af en seroprofil fra besætningen. Fejlene kan være forkert injektionssted ved vaccination, anvendelse af for korte kanyler, forkert opbevaring af vacciner etc.

I Danmark er diagnostik ved kliniske udbrud af rødsyge begrænset til en bakteriologisk dyrkning. Der er et ønske fra svinedyrlægerne om serotypning af fundne isolater, men det bliver sandsynligvis ikke muligt. I Skotland findes et forskningslaboratorium, som tidligere har foretaget den traditionelle serotypning ved percipitations test, men der er lille sandsynlighed for at denne test udbydes som en kommerciel diagnostisk test i fremtiden. En anden mulighed, som er mere nærliggende og derfor også beskrevet i litteraturdelen af denne opgave, er inddeling af de forskellige serotyper efter deres Spa type. Disse undersøgelser foretages i udlandet. Man ville kunne udføre PCR på enten bakteriologiske isolater, væv eller hudlæsioner for at bestemme Spa typen, og derved kunne konkluderes om den vaccine, som anvendes, er den korrekte, eller om der skal vælges en anden.

7 REFERENCER

- 1) Almanjd P, Bilkei G: Evaluation of pyelonephritis in culled indoor and outdoor high parity sows. *Dtsch. Tierärztl. Wschr*; 2008.115: 34-37.
- 2) Bender JS, Kinyon JM, Kariyawasam S, Halbur PG, Opriessnig T: Comparison of conventional direct and enrichment culture methods for *Erysipelothrix* spp. from experimentally and naturally infected swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*; 2009. 21: 863-868.
- 3) Bender JS, Shen HG, Irwin CK, Schwartz KJ, Opriessnig T: Characterization of *Erysipelothrix* species isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine erysipelas outbreaks in the United States. *Clinical and Vaccine Immunology*; 2010. Oct: 1605-1611.
- 4) Borrathybay E, Gong F, Zhang L, Nazierbieke W: Role of the surface protective antigen A in the pathogenesis of the *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain C43065: *Journal of Microbiology and Biotechnology*; 2015. 25(2): 206-216.
- 5) Drejer G: Rødsyge giver store problemer: *Hyologisk*; 2014. Sept: 28-31.
- 6) Eamens GJ, Forbes WA, Djordjevic SP: Characterisation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from pigs associated with vaccine breakdowns. *Veterinary Microbiology*; 2006. 115: 329-338.
- 7) Gertenbach W, Bilkei G: Erysipelas: Potential involvement in urogenital disease of the sow. *Journal of Swine Health and Production*; 2002. 10(5): 205-207.
- 8) Ingebritson AL, Roth JA, Hauer PJ: *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Association of Spa-type with serotype and role in protective immunity. *Vaccine*; 2010. 28: 2490-2496.
- 9) Kaiser M: Knuderosen/rødsyge. *Videncenter for Svineproduktion*; 2013.
- 10) Matamoros AS, Blanch A, Camprodon A, Sogaard R, Maldonado J: Cómo evaluar la respuesta serológica frente a mal rojo en cerdos vacunados ?. *Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio (AVELIDA)*. 2015.
- 11) Opriessnig T: Skriftlig kommunikation. 2015
- 12) Opriessnig T, Wood RL: Erysipelas. *Diseases of Swine*; 12th edition: 750-758.
- 13) Shimoji Y: Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. *Microbes and Infection*; 2000: 965-972.

14) Svensmark B: Skriftlig kommunikation. 2015

15) To H, Nagai S: Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clinical and Vaccine Immunology*; 2007: 813-820.

16) Wang Q, Chang BJ, Riley TV: *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Veterinary Microbiology*; 2010. 140: 405-417.

17) Wanyoike SK, Bilkei G: Concurrent pathological and bacteriological findings in the urogenital organs and mammary glands of sows culled because of the chronic vulvovaginal discharge and swine urogenital disease (SUGD): a case study. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*. 2006.131(19): 686-691.

18) Iowa State University <http://vetmed.iastate.edu/research/labs/tanjaopr/diagnostic-tests>.