



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Lawsoniavaccin – en utvärdering

Jennifer Andersson

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:76*

Lawsoniavaccin – en utvärdering

Jennifer Andersson

Handledare: Magdalena Jacobson, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Examinator: Berndt Jones, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Lawsonia intracellularis, proliferativ enteropati, gris, vaccin, Enterisol® Ileitis vet., PCR, blocking ELISA

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:76*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
Bakgrund.....	3
Syfte	3
LITTERATURÖVERSIKT	4
Lawsonia intracellularis	4
Bakterien	4
Patogenes	4
Smittspridning.....	6
Diagnos	7
Behandling	7
Immunsvaret	8
Vaccinet	9
MATERIAL OCH METODER	12
Besättning	12
Djur	12
Vaccinering	12
Provtagning	12
Hantering av proverna	13
Faecesprover	13
Blodprover	16
RESULTAT	17
Könsfördelning	17
Hälsoläget	17
Dödlighet	18

Vikt	18
Provtagningsresultat.....	20
Faeces.....	20
Serologi.....	21
DISKUSSION.....	23
Hälsoläget	23
Dödlighet	24
Vikt och tillväxt	25
Resultat provtagningar.....	26
Konklusion.....	30
TACK.....	31
LITTERATURFÖRTECKNING.....	32

SAMMANFATTNING

Porcin proliferativ enteropati (PPE) är en vanligt förekommande tarmsjukdom bland tillväxtgrisar över hela världen och orsakar stora ekonomiska förluster inom grisproduktionen. Sjukdomen orsakas av den obligat intracellulära bakterien *Lawsonia intracellularis* och är en vanlig orsak till diarré och nedsatt tillväxt bland unga djur. För att kontrollera och förhindra *Lawsonia intracellularis*-orsakade infektioner har ett oralt, levande och attenuerat vaccin (Enterisol ® Ileitis vet.) framställts. Syftet med denna studie var att utvärdera vaccinet i en smågrisproducerande svensk besättning.

En fall-kontrollstudie utfördes i en sektionerad, smågrisproducerande, svensk besättning med en känd infektionsstatus avseende *Lawsonia intracellularis*, där man vet att smittan finns i tillväxtavdelningen.

36 smågrisar från 18 kullar i en grisningsomgång valdes parvis ut att delta i försöket och delades in i två grupper, där hälften av grisarna fick vaccin och andra halvan fick placebo vid försökets start. Målet var att hitta par av grisar som var lika varandra avseende kön, hälsostatus, genetisk bakgrund och vikt vid försökets början. Vikt och tillväxt, mortalitet, fekal utsöndring av bakterien samt serologiskt antikroppssvar utvärderades sedan genom upprepade provtagningar över en nioveckors period under hösten 2010.

Provtagning av blod och faeces utfördes precis innan vaccinering, tre veckor senare (dagen innan flytt till tillväxtavdelningen), tre veckor efter flytt till tillväxtavdelningen, samt omedelbart innan förflyttning därifrån (sex veckor efter insättning). Faecesprover samlades även dagen efter vaccinering. Faecesprover analyserades med Realtids-PCR för att påvisa *Lawsonia intracellularis*-DNA. Blodprover analyserades med blocking ELISA för att påvisa antikroppar mot *Lawsonia intracellularis*.

Enligt resultaten av denna studie har vaccinet inte gett upphov till så många positiva faktorer att det tveklöst kan anses fördelaktigt att använda i svenska besättningar. Ingen signifikant ökad skillnad i daglig tillväxt har konstaterats. Dessutom förekom en stor variation i tillväxt och storlek bland de vaccinerade grisarna. Vaccinet har inte heller visat sig ge en förbättrad hälsostatus eller sänkt mortalitet. Det är dessutom svårvärderat huruvida vaccinet verkligen ger ett fullgott skydd mot *Lawsonia intracellularis*, eftersom bakterien påvisas i lika hög grad hos vaccinerade som ovaccinerade djur och eftersom antikroppssvaret är fördröjt och i vissa fall helt uteblivet. För att helt kunna utvärdera vaccinet skulle en större studie vara önskvärd.

SUMMARY

Porcine proliferative enteropathy (PPE) is a common intestinal disease found in pigs after weaning all over the world, resulting in significant economic losses in pork production. The disease is caused by the obligate intracellular bacterium *Lawsonia intracellularis* and is a common cause of diarrhea and poor growth in young animals. In order to control and prevent *L. intracellularis*-caused infections, an oral live attenuated vaccine (Enterisol ® Ileitis vet.) was developed. The purpose of this study was to determine the effects of the vaccine in a Swedish piglet-producing herd.

The study was done in a Swedish piglet-producing herd with a known *Lawsonia intracellularis*-status in the grower facilities.

Thirty-six piglets from 18 litters were pairwise selected and assigned to one of two groups in the present case-control study. One group received the vaccine and the other group received placebo. The aim was to find pairs of pigs that were similar regarding sex, general health, genetic background and weight in the beginning of the study. The effects investigated included; selected growth parameters, mortality, fecal shedding and serologic response over a 9 week period during the autumn 2010.

Fecal and blood samples were collected just before vaccination, three weeks later (the day before weaning) three weeks after moving to the grower facilities, and immediately before sale (after six weeks in the grower facilities). Fecal samples were also collected the day after vaccination. Fecal samples were analyzed by real-time PCR for the detection of *Lawsonia intracellularis* DNA. Blood samples were analyzed by blocking ELISA for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis*.

The results from this study did not provide sufficient evidence that the vaccine will be advantageous to use in Swedish herds. No significant increased difference in daily weight gain was found. In addition, there was a large variation in growth and size among the vaccinated pigs. The vaccine has not been shown to improve the general health or reduce the mortality. It is also difficult to evaluate whether the vaccine actually gives full protection against *Lawsonia intracellularis*, when the antibody response is delayed and in some cases not-expressed. To fully evaluate the vaccine efficacy, a larger study would be desirable.

INLEDNING

Bakgrund

Porcin proliferativ enteropati (PPE) orsakas av bakterien *Lawsonia intracellularis*. Sjukdomen är en av de viktigaste orsakerna till tarmstörningar och dålig tillväxt hos växande grisar, och är påvisad i 48 % av svenska smågrisproducerande besättningar (Jacobson, 2005).

Sjukdomen medför ett avsevärt lidande för djuren och stora ekonomiska förluster för grisproducenten. Djur med *Lawsonia*-infektion växer sämre och är betydligt äldre än friska grisar vid förmedling. Smittspridning inom en besättning påverkas av faktorer som sektioneringsgrad, rengöring och desinfektion mellan omgångar och ”tomtiden” mellan omgångarna. Profylax har tidigare baserats på förändringar i djurflöden, rengörings- och desinfektionsrutiner som syftat till att minska/förhindra smittspridning inom och mellan besättningar.

Numera finns dock ett peroralt vaccin lanserat på marknaden. Vaccinet baseras på en levande, attenuerad stam av *Lawsonia intracellularis* som med ingivare ges peroralt till smågrisar i samband med avvänjningen, alternativt via dricksvatten till större, växande grisar.

Det har tidigare gjorts ett flertal studier utomlands för att dokumentera vaccinets säkerhet och dess positiva effekt på djurens tillväxt, men inga utvärderingar har utförts efter svenska förhållanden. De projekt som gjorts har varit av modellen före-efter, utan att man tagit hänsyn till alla faktorer som kan tänkas påverka ett sådant upplägg (klimat, årstid, besättning, smittryck, kön, storlek, genetiska skillnader mellan grisar osv.). Få oberoende studier har gjorts.

Syfte

Syftet med denna fall-kontrollstudie var att utvärdera ett levande peroralt vaccin (Enterisol® Ileitis vet.) riktat mot infektioner orsakade av bakterien *Lawsonia intracellularis*. Vaccinet administrerades till smågrisar före avvänjning i en sektionerad, smågrisproducerande, svensk besättning med väl definierad infektionsstatus avseende *Lawsonia intracellularis*. Validering av vaccinet har skett genom upprepade vägningar och provtagningar av parvis utvalda djur.

LITTERATURÖVERSIKT

Lawsonia intracellularis

Bakterien

Lawsonia intracellularis är en intracellulär stavformad bakterie, som kan infektera ett flertal djurslag (bl.a. häst, hamster, marsvin, hund, kalv, lamm, iller, hjort, kanin, struts, råttor, igelkott, vildsvin, varg, giraff och apa), men är vanligast förekommande och mest diagnostiserad som tarmpatogen hos gris (Lawson & Gebhart, 2000, Herbst *et al.*, 2003, Tomanova *et al.*, 2003).

Bakterien är en gramnegativ, microaerofil, pleomorf och icke sporulerande stav. Sjukdomens korrekta namn är porciner proliferativ enteropati (PPE) men den går ofta under benämningen ileit.

Bakterien är obligat intracellulär och därmed mycket svårödlad. Odling kan endast ske i speciella cellkulturer med noga bestämda gaskoncentrationer, och detta utförs bara vid ett fåtal laboratorier i världen (Guedes & Gebhart, 2003).

Sjukdomen beskrevs första gången 1931 hos gris, och redan då misstänktes en infektiös bakgrund (Biester & Schwarte, 1931). Senare kunde en intracellulär bakterie observeras i förändrade tarmavsnitt, och man antog länge att det rörde sig om *Campylobacter*. Detta då man oftast kunde påvisa olika arter av *Campylobacter* vid odling och dessutom var de intracellulära mikroorganismer som kunde iaktas, morfologiskt mycket lika *Campylobacter* (Lawson & Gebhart, 2000). Den okända bakterien omnämndes länge *ileal symbiont intracellularis*, innan den 1995 fick sitt nuvarande namn *Lawsonia intracellularis* (McOrist *et al.*, 1995).

Bakterien är spridd över hela världen och många länder har en mycket hög andel infekterade besättningar. I Sverige har man med PCR-analys kunnat påvisa bakterien i 48 % av alla smågrisproducerande besättningar (Jacobson *et al.*, 2005).

Patogenes

Hos gris ses tarmförändringar framförallt i bakre delen av ileum, men även distala jejunum och proximala colon kan infekteras. Lokalisationen kan dock variera mellan djurslag, hos hund beskrivs t.ex. förändringar i magsäckens slemhinna (Leblanc *et al.*, 1993).

Lawsonia intracellularis infekterar omogna enterocyter på kryptepitelets botten i tarmen. De intracellulära mikroorganismerna återfinns fritt och jämnt fördelade i tarmepitelets apikala cytoplasma. Bakterien delar sig fritt i cytoplasman och stimulerar på okänt sätt de infekterade cellerna till konstant celldelning och proliferation medan normal differentiering upphör (Smith & Lawson, 2001).

Den snabba delningshastigheten ger en snabb tillväxt av omogna kryptceller, vilket är orsaken till de makroskopiska och mikroskopiska förändringar som uppträder i tarmen (Lawson & Gebhart, 2000).

Histologiskt ses hyperplasi av kryptepitelet med långa, grenade tarmkryptor, ökad andel mitos och avsaknad av bägarceller. I den apikala cytoplasman ses smala,

böjda, stavformade bakterier, vilka kan färgas in med Warthin-Starryfärgning (Ward & Winkelman, 1990). Makroskopiskt ses dessa förändringar som en förtjockad och veckad tarmmukosa (McOrist *et al.*, 1995).

Avsaknad av bägarceller och därmed avsaknad av mukus gör tarmslemhinnan skör och mer känslig för sekundärinfektioner. Proliferationen av omogna enterocyter i kryptepitel och tarmslemhinna resulterar i nedsatt näringsupptag och diarré. Infektionsdosen avgör hur stort tarmavsnitt som drabbas och det i sig avgör hur allvarliga symtomen blir. Beroende på hur stor del av tarmen som drabbas ses olika symtom och allvarlighetsgrad. De kliniska symtomen är framförallt diarré och nedsatt tillväxt. Problemen orsakar stora ekonomiska förluster för grisproducenterna.

Om smittan kommer in i en besättning, tidigare fri från sjukdomen, blir sjukdomsförloppet mer dramatiskt, med allvarliga, ofta blodiga diarréer och med en märkbart förhöjd dödlighet. Vartefter immunförsvaret mot bakterien stärks i besättningen blir utbrotten mildare, och övergår i en kronisk form med sämre tillväxt, fler ”pellegrisar”, och mindre allvarliga diarréutbrott (Ward & Winkelman, 1990).

Sjukdomen uppträder i fyra olika former hos gris, vilka baseras på tarmens morfologiska utseende vid obduktion: Porcin intestinal adenomatos (PIA), Nekrotisk enterit (NE), Regional ileit (RI) och Proliferativ hemorragisk enteropati (PHE). Av dessa anses PIA vara den kroniska, okomplicerade formen, NE tros vara en allvarlig sekundärinfektion av PIA. RI anses vara tillfrisknandestadiet av NE och PHE betraktas som den akuta formen av sjukdomen (Rowland & Lawson 1975). På senare tid föredrar man istället att använda termerna akut (PHE) eller kronisk (PIA eller NE) form av sjukdomen (Bronsvort *et al.*, 2001).

Den kroniska formen är vanligast och drabbar framförallt tillväxtgrisar. Grisarna tycks vara mest känsliga för att drabbas av infektionen mellan sex och 20 veckors ålder. Yngre grisar får oftast lindrigare symtom än äldre (Ward & Winkelman, 1990).

Skadorna som uppstår i tarmen resulterar kliniskt i gråbrun diarré, raggig hårrem, nedsatt foderkonsumtion och försämrad tillväxt. Mortaliteten är vanligtvis låg (1-5 %) och förknippas framförallt med sekundärinfektioner (Winkelman & Dee, 1996).

Enstaka individer som drabbas av sekundärinfektioner får nekroser i tarmslemhinnan i tunica muscularis som läker av med bindvävsinväxt. Detta ger en förhårdnad tarm och kan på sikt leda till strikturer, eller ses annars som bifynd vid slakt. Bland subkliniskt infekterande djur ses försämrad tillväxt som enda symtom.

Den akuta formen av sjukdomen är mer ovanlig och drabbar oftast något äldre djur som gyltor, suggor och stora slaktsvin (4-12 månader gamla). Utbrotten är oftast inte lika omfattande men mortaliteten är högre för den akuta formen (upp mot 50 %). Sjukdomsformen karaktäriseras av kraftiga och omfattande

tarmskador med blödningar. Plötsliga perakuta dödsfall förekommer och vid obduktion ses ett anemiskt kadaver med petekiella blödningar i tarmslemhinnan och blodigt tarminnehåll. Dessa lesioner misstänks vara relaterade till en immunmedierad reaktion (Friendship *et al.*, 2005). I den akuta fasen kan blodig diarré ses i kombination med försämrat allmäntillstånd. Feber kan förekomma men sjukdomen är generellt begränsad till tarmen och djuren kan istället ha undertemperatur (Love *et al.*, 1977).

Smittspridning

Den kända smittvägen är fekal-oral men utbrott har även beskrivits i SPF-besättningar, och därmed kan även andra, okända smittvägar vara aktuella (Cooper & Gebhart, 1998).

Studier har visat att *Lawsonia intracellularis* kan överleva utanför värdjuret i 14 dagar i faeces vid 5-15°C (Collins *et al.*, 2000). Ett flertal indirekta spridningsvägar har föreslagits, bl.a. redskap, skyddskläder osv. Trots förebyggande åtgärder som separata skyddskläder och desinficerande fotbad, har man sett att bakterien lätt sprids mellan boxar i samma stall (Boesen *et al.*, 2004). Smittan blir lätt kvar i besättningen i tillväxtstallar. Den vanligaste och viktigaste smittspridningen sker sannolikt via symtomlösa smittbärare.

Infektionsdosen är låg: 10^4 - 10^6 organismer. Grisar kan urskilja upp till 7×10^8 bakterier/g faeces (Smith & McOrist, 1997). Urskiljning av bakterien kan ses upp till tolv veckor efter infektion (Guedes & Gebhart, 2003).

Det är oklart i vilken utsträckning andra djurslag, t.ex. gnagare kan fungera som vektorer och sprida smittan till grisar (Smith & Lawson, 2001). Man har hittat gnagare i grisbesättningar som visat sig vara positiva för *Lawsonia*, men betydelsen av dessa som smittspridare är oklar (Friedman *et al.*, 2008).

Inom en besättning sprids *Lawsonia intracellularis* huvudsakligen pga. bristande rengöring, blandning av djur i olika åldrar samt suggor som agerar subkliniska bärare av bakterien (Jensen *et al.*, 2005). Man har i Sverige inte kunnat påvisa överföring av *Lawsonia intracellularis* eller dess antikroppar mellan dräktiga suggor och deras avkommor (Jacobson *et al.*, 2010a), men att denna möjlighet finns kan inte uteslutas och fler studier skulle behövas på området (Jensen *et al.*, 2005).

Modern grishållning med ett stort antal mottagliga, unga djur som hålls tillsammans på begränsad yta, dåligt utförd rengöring och desinficering samt otillräcklig ”tomtid” och upptorkning, bidrar till att bakterien lättare kan etablera sig i en besättning (Collins *et al.*, 2000).

För att förebygga att få in smittan är god biosäkerhet viktigt. Att tillämpa all in – all out, inkluderande rengöring och desinficering samt tillräckligt lång ”tom-tid” mellan omgångar är signifikant associerad med en minskad risk för proliferativ enteropati (Bronsvort *et al.*, 2001, Stege *et al.*, 2001).

Spridning av *Lawsonia intracellularis* mellan besättningar sker huvudsakligen via införsel av nya djur som bär på smittan (Smith *et al.*, 1998), därav är karantän en viktig och effektiv faktor för att förebygga smittspridning.

Inkubationstiden är vanligen mellan två och tre veckor, och sjukdomen ses ofta tre-fyra veckor efter avvänjning.

Betydelsen av besättningens storlek är oklar. En studie visade inget samband med besättningsstorlek (Stege *et al.*, 2001), en annan visade ett samband mellan besättningar med fler än 500 suggor och förekomst av proliferativ enteropati (Smith *et al.*, 1998).

Olika studier visar att risken för infektion ökar om djuren hålls på betongspalt (Bronsvort *et al.*, 2001), och minskar om djuren hålls på ströbädd eller helt golv (Smith *et al.*, 1998), medan andra studier inte har visat någon skillnad mellan olika golvtyper. Eventuellt tros sambandet istället bero på att spaltgolv generellt rengörs sämre. En studie har visat att utomhusdrift minskar risken för infektion med *Lawsonia intracellularis* (Bronsvort *et al.*, 2001).

Inget samband har påvisats mellan typ av foder, utfodringssystem eller vattensystem i en studie (Smith *et al.*, 1998). I en dansk studie visades att hemmablandat, opelleterat foder minskade prevalensen av *Lawsonia intracellularis* (Stege *et al.*, 2001).

En ökad förekomst av *Lawsonia*-infektioner har setts i besättningar med förekomst av annan sjukdom (SEP) (Smith *et al.*, 1998).

Diagnos

Tidigare fastställdes diagnosen genom påvisande av typiska tarmförändringar vid obduktion samt genom användning av histokemiska infärgningstekniker (t.ex. Warthin-Starry). Då den intracellulära bakterien är mycket svårödlad är odling inte användbart för rutindiagnostik. Numera används istället olika molekylärbioologiska metoder för identifikation av specifikt DNA, såsom PCR och immunohistokemi (Jacobson *et al.*, 2010b).

PCR har god sensitivitet vid användande av vävnadsprov eller faeces från djur med uppenbar klinisk sjukdom men detekterar *Lawsonia intracellularis* i en lägre frekvens i faecesprover tagna från subkliniskt infekterade djur (Jacobson *et al.*, 2004).

Andra diagnostiska metoder inkluderar demonstration av specifika antikroppar i serum. Detta kan användas för att identifiera infekterade besättningar och för att bedöma infektionstidpunkt genom att utvärdera tiden för serokonvertering (Knittel *et al.*, 1998).

Behandling

För att ha effekt mot *Lawsonia intracellularis* krävs att de antimikrobiella medel som används har rätt farmakodynamik. En förutsättning är att substansen distribueras till hela mag-tarmkanalen och sedan absorberas intracellulärt med kvarvarande aktivitet. Klortertetracyklin, lincomycin-spectinomycin, tylosin och

tiamulin används vanligen i praktiken och rapporteras ha god effekt (McOrist *et al.*, 2000).

Inga studier finns beträffande antibiotikaresistens för *Lawsonia intracellularis*, främst beroende på svårigheterna att odla fram mikroben (Jacobson *et al.*, 2010b).

I Sverige används i första hand tylosin (makrolid). Behandling görs av påverkade, sjuka grisar. Drabbade djur som behandlas i tid tillfrisknar vanligen efter 2-3 månader. Bakterien har med PCR kunnat påvisas i avföringen även efter behandling, däremot kan inte den använda tekniken skilja på DNA från döda eller levande bakterier.

Om möjligt viktigare är dock att arbeta förebyggande för att bli av med smittan och förhindra att den kommer in i en besättning. Detta bl.a. genom god biosäkerhet, sektioneringsgrad, noggrann tvätt och desinficering mellan omgångar, tillämpning av ”all in-all out” osv.

Immunsvaret

Att lokal humoral immunitet i tarmmukosa representeras av sekretion av IgA, är en känd relevant försvarsmekanism mot enteropatogena mikroorganismer (Lamm *et al.*, 1995, Goldsby *et al.*, 2000). Immunohistokemiska studier av tarmsektioner från grisar naturligt infekterade med *Lawsonia intracellularis* har visat en stor ackumulering av IgA i den apikala cytoplasman i prolifererande enterocyter (Lawson *et al.*, 1979, McOrist *et al.*, 1992). Även vid tarmspolning av infekterade grisar har IgA detekterats (Guedes *et al.*, 2003). I en studie där man undersökt det humoral immunsvaret hos fem veckor gamla grisar som naturligt eller experimentellt infekterats med renkultur av *Lawsonia intracellularis* kunde IgG antikroppar först detekteras två veckor efter smittotillfället. Antikroppstitern var som störst i slutet av tredje veckan och tenderade sedan att sjunka (Knittel *et al.*, 1998). Pga. bakteriens intracellulära karaktär är serum-IgG troligen inte skyddande för infektionen, medan sekretorisk IgA och cellmedierat immunsvaret kan spela en större roll. Trots det har detektion av serum IgG visat sig vara en användbar parameter för att undersöka tidigare exponering för *Lawsonia intracellularis* (Guedes & Gebhart, 2003).

Antikroppar har i försök initialt detekterats en till tre veckor efter smittotillfället och kunde fortfarande detekteras hos vissa grisar efter 13 veckor. Fekal utsöndring sågs efter en vecka och varade intermittent 12 veckor efter exponeringen bland utsatta grisar (Guedes & Gebhart, 2003). Enligt en ny svensk studie varierade intervallet mellan utsöndring av bakterien i faeces och påvisande av antikroppar i serum från noll till sex veckor (Jacobson *et al.*, 2010a).

En studie antyder att djur som tidigare varit infekterade inte utsöndrade några mätbara nivåer av *Lawsonia intracellularis* i avföringen och inte heller hade några kliniska symtom på sjukdomen vid en re-infektion. Dessa upptäckter talar för att bakterien vid andra smittotillfällen troligen blev inaktiverad innan den lyckades ta sig in i och kolonisera cellerna i tarmen (Collins *et al.*, 2001). Utvecklingen av skyddande immunitet mot *Lawsonia intracellularis* har visats hos grisar som utsatts för smittan vid upprepade tillfällen i kontrollerade försök. Dessa studier

antyder att ett modifierat levande vaccin skulle kunna inducera skyddande immunitet mot proliferativ enterit (Kroll *et al.*, 2004a). I försök har man sett att serokonvertering inte är nödvändigt för att ge vaccinerade grisar skydd mot sjukdomen, vilket talar för att icke-humoral faktorer (dvs. cellmedierade) som stimuleras vid vaccination möjligtvis är mer viktiga för immunitet mot *Lawsonia intracellularis* (Kroll *et al.*, 2004a).

Det cellmedierade immunsvaret är en viktig funktion involverad i infektion orsakad av intracellulära organismer, såsom *Lawsonia intracellularis* (Goldsby *et al.*, 2000). Beskrivande immunocytologiska studier av sektioner av tarmvävnad från grisar affekterade av akut eller kronisk form av proliferativ enteropati har visat en mild infiltration av cytotoxiska T-celler, makrofager och B-lymfocyter bärande MHC II struktur vid starten av det cellmedierade immunsvaret (McOrist *et al.*, 1992). Vid experimentell infektion av möss med *Lawsonia intracellularis* har interferon gamma visat sig ha en betydande roll för att begränsa infektionens utbredning i tarmen och även minska den cellulära proliferation som associeras med *Lawsonia intracellularis* (Smith *et al.*, 2000).

Vaccinet

Enterisol® Ileitis vet. tillverkas av Boehringer Ingelheim Danmark A/S. Enligt tillverkarens bipacksedel innehåller en dos (2ml) av vaccinet minst $1 \times 10^{4,9}$ TCID₅₀, max $1 \times 10^{6,1}$ TCID₅₀. (TCID = Tissue Culture Infective Dose). Spädningsvätskan innehåller sterilt vatten. Vaccinet är levande, försvagat och frystorkat, och innehåller ett danskt isolat av *Lawsonia intracellularis*. Enterisol® Ileitis vet. är ett modifierat levande oralt vaccin som har förmågan att inducera både humoralt och cellmedierat immunsvaret. Utvärdering av vaccinet i flertalet studier har visat att det ger ett effektivt skydd mot infektion med antingen ett homologt eller heterologt isolat av *Lawsonia intracellularis*. Dessa studier har visat en minskning av bakterieutsöndring, minskad utveckling av tarmskador samt reducering av produktionsförluster bland utsatta grisar. Enligt tillverkaren har man i fältförsök visat en genomsnittlig ökad tillväxt på upp till 30 g/dygn mellan vaccinerade och ickevaccinerade grisar. Skyddande immunitet utlovas att uppnås tre veckor efter vaccination för att sedan kvarstå i minst 17 veckor. Bakterien utsöndras i fekalierna högst en till tre dagar efter vaccinering. Ingen spridning av bakterien sker till ovaccinerade djur. Vaccinstammen kan inte skiljas från fältisolat med gängse metoder. Serokonvertering efter vaccinering kan inte alltid påvisas och är inte relaterad till effekten. Vaccinet rekommenderas till avvanda grisar från tre veckors ålder. Antimikrobiella medel med effekt mot *Lawsonia* spp. får inte användas under en period av minst tre dagar före till tre dagar efter vaccination med Enterisol® Ileitis vet. Vaccinet ges oralt via drench, via tråg eller dricksvatten.

Samtliga administrationssätt har i studier visat sig ge ett likvärdigt resultat och ett fullgott skydd mot *Lawsonia*. Vaccinering via dricksvattnet ger även ett minimalt stresspåslag bland grisarna (Kroll *et al.*, 2004b). Vaccinet har testats stabilt i vatten i över fyra timmars tid. Fettfri mjölk kan stabilisera vaccinet ytterligare (Keller *et al.*, 2004).

Korrekt diagnos, tidpunkt för vaccinering och ett antibiotikafritt fönster kring vaccinering är de viktigaste faktorerna för att effekten och den ekonomiska lönsamheten av vaccinering med Enterisol® Ileitis ska maximeras (Voets, 2006). Enligt försök finns ingen fördel med att vaccinera såvida inte *Lawsonia* förekommer i en besättning (Pelger *et al.*, 2004).

I en studie har vaccinets säkerhet undersökts genom att överdosera vaccinet 25 gånger i dricksvatten till tre veckor gamla grisar utan att några negativa bieffekter setts (Kroll *et al.*, 2004 c). Samtidigt tillskott av zinkoxid har inte visat sig ge någon negativ påverkan på vaccinet (McOrist & Smits, 2006, Kritas *et al.*, 2006). Inga oönskade bieffekter, såsom t.ex. dödlighet eller diarréförekomst har konstaterats vid vaccinering (Henke *et al.*, 2006, Yamaguchi *et al.*, 2006). I en fransk vaccinstudie tolkades en totalt låg frekvens diarré som ett tecken på att vaccinet är säkert och tillräckligt inaktiverat (Keïta *et al.*, 2004).

I en belgisk studie har man visat att vaccinet inte har någon negativ effekt på generellt hälsoläge eller dräktighetsresultat hos gyltor, som man vet är extra känsliga för att drabbas av den akuta formen av sjukdomen (Meyns *et al.*, 2004). Troligen kvarstår immuniteten för Enterisol® Ileitis bland gyltor i minst 2 år och troligtvis längre än 3,5 år (Sanford, 2006).

Huruvida vaccinerade djur utsöndrar *Lawsonia intracellularis* i faeces efter vaccinationstillfället, har undersökts med varierande resultat. Ingen utsöndring av bakterien i faeces kunde ses efter vaccinering i en amerikansk studie (Pelger *et al.*, 2004). I en fransk studie sågs utsöndring hos ett fåtal grisar i kontrollgruppen under de första veckorna. Troligen sker dock ingen överföring av bakterien mellan vaccinerade och ickevaccinerade grisar då inga positiva prover kunde ses i kontrollgruppen efter första vaccineringen (Keïta *et al.*, 2004). Både vaccinerade och icke vaccinerade djur urskiljde bakterien i faeces före och upp till 14 dagar efter vaccinationstillfället enligt undersökningar i Belgien (Meyns *et al.*, 2004), och i Tyskland (Nathues *et al.*, 2006), där man även såg en statistiskt signifikant lägre urskiljning bland grisar behandlande med Tylosin profylaktiskt.

Tidpunkt för serokonvertering skiljer sig även det mellan olika försök, men de flesta indikerar att antikropps bildningen är fördröjd och inkonsekvent (Pelger *et al.*, 2004, Keïta *et al.*, 2004). Serokonvertering sker två till fyra veckor efter smitta och vaccineringen bör ske minst tre veckor innan infektion/smitta äger rum för att grisarna ska kunna bilda tillräckligt med antikroppar i tid (Voets, 2006). Detekterbar antikroppstiter mot *Lawsonia intracellularis* sågs hos hälften av grisarna åtta veckor efter vaccinationstillfället och titern avtog sedan gradvis till upp mot 16 veckor efter vaccinationen (Yamaguchi *et al.*, 2006). Tidpunkten för serokonverteringen skiljer sig inte mellan vaccinerade och icke vaccinerade grisar som utsätts för smittan (Meyns *et al.*, 2004), och antikroppssvaret är lika starkt i båda grupperna (Nathues *et al.*, 2006).

Upprepade vaccineringar av suggor ger en viss maternell immunitet till avkomman. Detta har man sett då smågrisar efter vaccinerade suggor hade signifikant färre tarmskador än smågrisar efter icke vaccinerade suggor. Denna immunitet varade i genomsnitt under smågrisarnas 42 första levnadsdagar, och visade sig kliniskt som en högre daglig tillväxt. Grisar kan bli framgångsrikt

immuniserade av vaccinet även vid närvaro av maternell immunitet (Kroll *et al.*, 2004d). Potentiella anti-*Lawsonia* specifika laktogena egenskaper i colostrum och mjölk under diperioden interfererar inte eller försämrar vaccinets effekt mot *Lawsonia* vilket har visat sig ge ett effektivt och säkert skydd mot infektion åt dygns gamla grisar som saknar maternella antikroppar mot *Lawsonia* och som utsätts för smitta (Kroll *et al.*, 2006). Vaccinet har även testats på häst. Resultat från en studie indikerar även att dräktiga ston som vaccinerats mot *Lawsonia intracellularis* under dräktigheten, överför maternella antikroppar via placenta till sina föl. Dessa antikroppar kunde sedan detekteras mellan 11 och 56 dagar efter födseln (Pusterla *et al.*, 2009).

Effekten av vaccinet i olika delar av Europa och Asien konfirmerar ileit som en global orsak till ekonomiska förluster i grisindustrin (Kroll *et al.*, 2004a). Ett flertal studier har gjorts världen över där resultaten varit slående. Grisar vaccinerade med Enterisol® Ileitis vet. har en ökad tillväxt, högre slaktvikt, ökat foderutnyttjande, mindre storleks- och tillväxtvariation, lägre mortalitet, bättre hälsostatus och minskad antibiotikaanvändning, vilket bidrar till en stor ekonomisk vinning för grisproducenten (Hardge *et al.*, 2004, Kolb *et al.*, 2004, Kroll *et al.*, 2004c, Bulay *et al.*, 2006, Henke *et al.*, 2006, Kritas *et al.*, 2006, McOrist & Smits, 2006, Steinheuer *et al.*, 2006, Voets *et al.*, 2006, Yamaguchi *et al.*, 2006). Få studier har dock varit helt oberoende. En obduktionsstudie indikerar att vaccinet signifikant bidrar till färre makroskopiska och mikroskopiska tarmskador när vaccinerade grisar utsätts för *Lawsonia intracellularis* jämfört med ovaccinerade (Kroll *et al.*, 2004c). Minst skador ses dock hos ovaccinerade grisar som aldrig utsatts för infektionen (Kroll *et al.*, 2004b).

I många länder där man rutinmässigt ger antimikrobiella medel i profylaktiskt syfte har man konstaterat att det är mer ekonomiskt fördelaktigt att använda vaccin än antimikrobiella medel för att förebygga ileit orsakad av *Lawsonia intracellularis* (Kolb *et al.*, 2004, Bulay *et al.*, 2006). En studie i Mexico visade att även med reducerad användning av antimikrobiella medel växte vaccinerade grisar snabbare (Diaz & Chevez, 2006). Vaccinerade djur tycks även vara mer motståndskraftiga mot att drabbas av andra sjukdomar och bidrar därmed även till en generellt minskad antibiotikaanvändning (Henke *et al.*, 2006). Trots kontinuerlig användning av foderantibiotika konstaterades att ovaccinerade kontrollgrisar löpte åtta gånger högre risk att infekteras av *Lawsonia intracellularis* (Kolb & Sick, 2004).

Ett fåtal undersökningar har dock uppvisat avvikande resultat, där ingen skillnad i tillväxt, tarmförändringar, hälsostatus eller mortalitet mellan vaccinerade och ovaccinerade djur har kunnat konstateras. (Keita *et al.*, 2004, Kolb & Sick, 2004, Meyns *et al.*, 2004, Pelger *et al.*, 2004, Kritas *et al.*, 2006).

MATERIAL OCH METODER

Besättning

Försöket genomfördes i en grisningsomgång på en gård belägen strax utanför Uppsala. Gården är en konventionell gyltproducerande besättning och är väl dokumenterad avseende *Lawsonia*. Besättningen säljer huvudsakligen dräktiga gyltor av korsning Yorkshire x Lantras. Dessutom sker smågrisförsäljning via förmedling av korsningar Yorkshire x Lantras, samt Yorkshire x Lantras x Hampshire. Besättningen består av cirka 100 suggor, framförallt Yorkshire. Varje omgång består av 18 suggor som grisar in i endera av två grisningsavdelningar. Vanligen produceras 50-60 gyltämnen per omgång.

Grisningsintervallet är fyra veckor. Avvänjning sker vid fem veckors ålder, smågrisarna flyttas i samband med det till tillväxtavdelningen i en intilliggande byggnad. Man eftersträvar att kullarna ska hållas ihop vid flytten. Inget foderbyte sker utan grisarna har ett och samma foder fram till förmedling fyra-fem veckor efter insättningen.

Samtliga hittills gjorda provtagningar avseende *Lawsonia intracellularis* av smågrisar i grisningsavdelningen har varit negativa. Samtliga provtagningar av grisar i tillväxtavdelningarna har visat att urskiljningen av bakterien i avföring startar 2-3 veckor efter insättningen.

Djur

Grisarna föddes vecka 34, år 2010. Från varje kull (totalt 18 stycken) valdes ett syskonpar ut. Totalt ingick 36 grisar i försöket. Målet var att hitta par av grisar som var lika varandra avseende kön, hälsostatus, genetisk bakgrund och vikt vid försökets början. Detta för att minska felkällan ”slumpvis variation” ytterligare. Inom varje par lottades försöks- respektive kontrollgris och märktes med olivfärgade och numrerade öronbrickor (gula brickor för vaccinerade och blå brickor för kontrollgrupp). Lika vikt inom paren prioriterades före en jämn könsfördelning varför könsfördelningen bland de 18 paren var elva par kastrater och sju par gyltor.

Vaccinering

Vaccinering gjordes vid försökets start när smågrisarna var kvar i grisningsavdelningen, tre veckor innan flytt till tillväxtavdelningen. Detta då tidigare studier indikerar att infektion i denna besättning sker i tillväxtavdelningen. Grisarna vägdes, provtogs och märktes innan de vaccinerades. Vaccinet gavs i munnen med ingivare till försöksgrisarna. Kontrollgrisarna gavs motsvarande mängd placebo (vaccinets lösningsmedel utan tillsats av det frystorkade vaccinet). Separata ingivare (så kallade drench) användes för vaccin och placebo.

Provtagning

Provtagning av blod och faeces gjordes mellan september och november, 2010. Provtagning utfördes precis innan vaccinering, tre veckor senare (dagen innan flytt till tillväxtavdelningen), tre veckor efter flytt till tillväxtavdelningen, samt omedelbart innan förflyttning därifrån (sex veckor efter insättning). Vid varje

tillfälle togs ett faecesprov och ett blodprov från varje individ. Utöver detta samlades individuella faecesprov även dagen efter vaccinering (totalt fem provtagningstillfällen). Grisarna vägdes vid försökets början, tre veckor efter flytt till tillväxtavdelningen samt vid försökets slut. I samband med vägning och provtagning gjordes en allmän klinisk undersökning med bedömning av djurens kondition.

Vid första vägningstillfället sattes grisen i en plasthink ansluten till en fjädervåg, med en delning på 0,1 kg. Vid de två andra vägningarna då grisarna var tyngre användes istället en personvåg med en delning på 0,5 kg. Grisarna vägdes då upplyfta i famnen på en person. Grisens vikt erhöles sedan genom att dra av personvikten från totalvikten.

Faecesprov togs individuellt från rektum med puderfri handske. Blodprov för serologi togs från vena jugularis. Grisen fixerades i ryggläge vid provtagning. Vid sista provtagningen provtogs ett fåtal grisar istället stående pga. sin storlek. Vacutainerrör utan tillsats användes. Samtliga prover märktes med grisens gruppffärg, nummer och datum.

Vid vaccinationstillfället valdes två grisar per kull utifrån de uppställda kriterierna avseende kön, vikt och hälsostatus. Under all hantering av grisarna användes puderfria handskar. Grisarna vägdes och den gris som utsetts till vaccingris i paret provtogs först. Blodprov togs först och därefter samlades ett faecesprov från rektum. Därefter byttes handske och vaccinet administrerades. Grisen märktes slutligen med korrekt färgad och numrerad öronbricka. Första paret fick nummer 1, andra paret nummer 2 osv. Proceduren upprepades sedan med kontrollgrisen i samma par, som istället för vaccin fick motsvarande mängd placebo. Handskbyte utfördes endast efter faecesprovtagningen och därmed inte innan hantering av varje ny gris.

Vid övriga provtagningstillfällen togs först blodprov och därefter faecesprov, varpå handskar byttes enligt samma rutiner som tidigare. Vid de tillfällen grisarna vägdes, gjordes detta innan provtagningen utfördes. I de fall det ansågs nödvändigt fylldes numreringen på öronbrickan i, innan grisen sattes ner i sin box.

Vid första provtagningstillfället erhöles inget faecesprov från en av grisarna i kontrollgruppen (17), trots upprepade samlingsförsök.

Hantering av proverna

Faecesprover analyserades med realtids-PCR och blodprover analyserades med blocking ELISA.

Faecesprover

Preparering

Preparering av faecesprover inför PCR gjordes med hjälp av ett kommersiellt analyskit (QIAamp® DNA Stool Mini Kit, Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Proverna preparerades enligt tillverkarens medföljande instruktionsmanual. Cirka 180-220 mg av de frysta faecesproverna sattes till centrifugrör och blandades med

ASL-buffert vilket gjorde att en lysering skedde av cellerna i provet. Därefter tillsattes InhibitEX som är en unik reagent i tablettform som effektivt absorberar de komponenter i avföringen som kan degradera DNA, inhibera kommande enzymatiska reaktioner och hämma PCR-processen. Proteiner digererades och denaturerades i närvaro av proteinas K under inkubation vid 70°C. Vätkyld etanol 99 %, överfördes till lysatet som sedan sattes till QIAamp-kolonner. DNA absorberades på ett filtrerande membran i QIAamp-kolonnen under kortvarig centrifugering. Optimalt pH och saltkoncentration i lysatet gör att eventuella rester av digererade proteiner eller andra föroreningar som kan ha en inhiberande effekt på PCR, inte tas upp på det filtrerande membranet. Det DNA som bundit till membranet renades i två centrifugeringssteg. För optimal rening användes två olika buffertar (AW1 och AW2) för att garantera totalt avlägsnande av föroreningar utan att påverka DNA-bindningen. Renad, koncentrerad DNA frigjordes sedan från membranet genom att en låg saltbuffert (AE) tillsattes, inkuberades i rumstemperatur och centrifugerades. Filtratet frystes sedan -20 °C i väntan på PCR-analys.

PCR

De färdiga PCR-produkterna analyserades med realtids-PCR (Applied Biosystems, 7500 Fast Real-Time PCR System).

En mastermix bestående av 3 µL avjoniserat, destillerat vatten, 7,5 µL PCR-buffert (Quanta Biosciences, PerfeCTa qPCR FastMix, UNG, Low ROX), 0,75 µL av 10 pmol Primer PE-F, 1,25 µL av 10 pmol Primer PE-R, 0,25 µL av 10 pmol Probe FAM, 0,25 µL av 10 pmol Probe Cy5, samt 1 µL mimic i spädning 10^{-4} sattes per brunn. 1 µL templat tillsattes sedan i respektive brunn enligt ett i förväg iordninggjort protokoll. Framrenat *Lawsonia*-DNA från ett tidigare känt positivt prov användes som positiv kontroll och som negativ kontroll användes mastermix utan DNA/templat. Brunnarna centrifugerades för att sedan sättas i PCR-apparaten. Samtliga PCR gjordes i triplikat.

Provet inkuberas under 2 minuter i 50°C för att sedan gå upp till 95°C under 20 sekunder då aktivering av det värmetåliga enzymet i PCR-bufferten, Taq-polymeras, sker. Sedan följer upprepade cykler om 3 sekunder i 95°C följt av 30 sekunder i 60°C. Vid upphettning till 95°C denatureras, dvs. delas, de dubbelsträngade DNA-fragmenten. När temperaturen sedan sänks till 60°C binder primrarna in till var sin enkel DNA-sträng (annealing) och därefter börjar enzymet binda till nukleotider vilket gör att ett nytt dubbelsträngat DNA-fragment bildas med primrarna som start (elongering). Denna cykel upprepas 40 gånger vilket ger en teoretisk anrikning på ca tusen miljoner DNA-fragment (amplikon) per ursprunglig DNA-sträng. Dock brukar inte effektiviteten i varje cykel vara 100 %.

Primer PE-F (forward) fäster in och går medströms på DNA-sekvensen, Primer PE-R (reverse) fäster in och går motströms. De fäster därmed in på vardera änden av en DNA-sträng. Sekvensen för primer PE-F är: 5'-GCG CGC GTA GGT GGT TAT AT-3', och för primer PE-R: 5'-GCC ACC CTC TCC GAT ACT CA-3' (Lindecrona *et al.*, 2002)

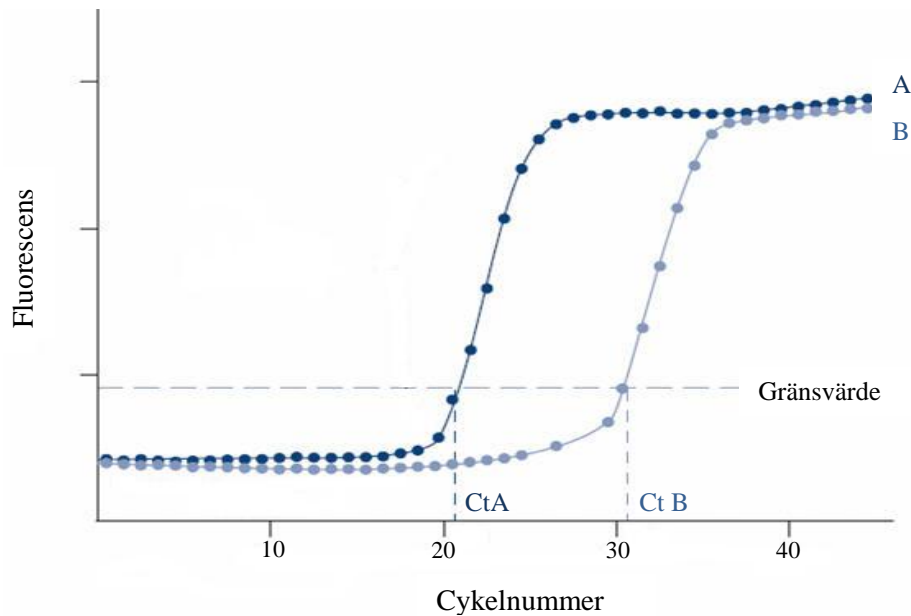
En probe är ett mindre DNA-fragment som fäster in mitt på den DNA-sekvens man vill amplifiera. Denna probe har en "reportermolekyl" i ena ändan som har

förmågan att fluorescera, och en quencher med förmåga att släcka ut reporterens fluorescens i andra ändan. Reportern börjar fluorescera endast då det tilltänkta målfragmentet amplifieras och nya DNA-fragment skapas. Detta sker genom att polymeraset vandrar längs det nya DNA-fragmentet och läser av detta. När enzymet sedan kommer till proben klyvs denna och reportern separeras från quenchern och fluorescensen kan sedan mätas med PCR-instrument.

När enzymet når proben avges en ljussignal som PCR-maskinen uppfattar och registrerar. Probe FAM fäster in på *Lawsonia* DNA medan Probe Cy5 fäster in på mimicen. De avger ljus av olika våglängd, vilket gör att man kan skilja dem åt. Sekvensen för probe FAM är: 5'-6-FAM-CAC CGC TTA ACG GTG GAA CAG CCT T-BHQ1-3'. Sekvensen för probe Cy5 är: 5'-Cy5-CAA CCA ATG ATG CCC GTT CCT-BHQ-2-3'.

En mimic bestående av en 166 baspar lång DNA-sekvens användes som internkontroll. Denna DNA-sekvens' uppbyggnad skiljer sig från den utvalda sekvensen hos mikroorganismen, bortsett från längst ut i ändarna där primrarna fäster in, där uppbyggnaden är identisk. Mimicens DNA-sekvens anrikas alltså med samma primrar som *Lawsonia intracellularis*. Mimicens DNA-sekvens är längre än mikroorganismen (98 baspar) vilket gör att de kan skiljas från varandra efter PCR-reaktionen (Jacobson et al., 2003). För att mimicen inte ska konkurrera ut ev. *Lawsonia* i provet är det viktigt att mängden mimicomolekyler är samma som detektionsgränsen för DNA från *Lawsonia intracellularis*. Om en för stor mängd mimicomolekyler används i analysen ökar därmed de falskt negativa svaren pga. konkurrens. Total avsaknad av mimic under PCR-processen indikerar att PCR-reaktionen inhiberats helt eller delvis, vilket innebär att ett negativt resultat inte kan tolkas.

Vid realtids-PCR erhålls en amplifieringskurva för positiva PCR-reaktioner. Antalet amplikon och därmed även signalen ökar exponentiellt tills en platófas nås, vilket främst beror på att aktiviteten hos enzymet är förbrukad, men även att fria nukleotider, primers och probe tar slut eller att PCR-produkter finns i sådant överskott att DNA-strängarna i dessa hittar och hybridiserar till varandra oftare än till primer och probe. I analysen läggs ett tröskelvärde in vilket motsvarar den fluorescensnivå som tillväxtkurvan ska passera för att provet skall tolkas som positivt. Vid den punkt där amplifieringskurvan skär tröskelvärdet kan man på x-axeln avläsa cykeltröskelvärdet (Ct-värdet) för det positiva provet. Ct (cycle threshold) definieras som det antal cykler som krävs för att den fluorescerande signalen skall överstiga gränsvärdet och därmed visas som ett positivt prov. Ct-värdet är omvänt proportionellt till mängden tillgängligt DNA som finns i provet. Detta innebär att ju lägre Ct-värde, desto större mängd DNA finns i provet. Vid kvalitativ analys vill man påvisa, alternativt inte påvisa, sökt nukleinsyra. Påvisas nukleinsyran får man ett Ct-värde, annars inte. Se figur 1.



Figur 1. Två positiva prover A och B, med olika Ct-värde.

Blodprover

Blodproverna utan tillsats centrifugerades och serum förvarades i -20°C i väntan på analys med blocking ELISA.

Blocking ELISA

Ett speciellt kit framtaget för blocking ELISA användes, tillverkat av: bioScreen European Veterinary Disease Management Center GmbH, D-48149 Münster, Germany (Keller *et al.*, 2006). Analys för att påvisa antikroppar mot *Lawsonia intracellularis* utfördes sedan enligt tidigare beskriven metod för blocking ELISA (Jacobson *et al.*, 2010c).

RESULTAT

Könsfördelning

Könsfördelningen bland de utvalda 18 paren var elva par kastrater och sju par gyltor, se tabell 1. Lika vikt inom paren prioriterades före en jämn könsfördelning.

Tabell 1. Könsfördelningen bland paren

Par nr	Kön	Par nr	Kön
1	Gyltor	10	Kastrater
2	Kastrater	11	Gyltor
3	Gyltor	12	Kastrater
4	Kastrater	13	Gyltor
5	Kastrater	14	Kastrater
6	Kastrater	15	Gyltor
7	Kastrater	16	Gyltor
8	Kastrater	17	Kastrater
9	Gyltor	18	Kastrater

Hälsoläget

Vid försökets start 2010-09-09, samt efterföljande dag, noterades en generell förekomst av treveckors-diarré bland smågrisarna i grisningsomgången. Övriga iakttagelser att nämna var att kontrollgrisen i par 12 hade en klövinfektion på höger bakben. Två av smågrisarna (vaccingris 6 och kontrollgris 15) fick kraftig vaguspåverkan efter blodprovstagning. Dessa grisar hölls under uppsikt under resterande provtagning och släpptes sedan åter till sina respektive kullar när de bedömdes vara i normalt tillstånd.

Då antalet suggor med kullar var fler än antalet boxar i grisningsavdelningen, befann sig en av kullarna som ingick i försöket i en annan grisningsavdelning, vägg i vägg med den första. När det sedan var dags att lämna plats för nästa grisningsomgång flyttades de kullar som befann sig där ut i en närliggande lada. För att undvika att det par av grisar som ingick i försöket skulle byta miljö hade dessa två smågrisar (par 18) flyttats in till en annan sugga och hennes smågrisar (par 14). Det par som förflyttades var från början cirka 1 kg tyngre än det par av grisar som de blandades med.

Vid tredje provtagningen 2010-09-29, innan flytt till tillväxten, var hälsoläget i kullarna generellt gott. En notering gjordes angående par 14, som såg eftersatta ut och den vaccinerade grisen i detta par hade även vattentunn diarré vid detta tillfälle.

I samband med flytten till tillväxtavdelningen slogs vissa kullar samman. Detta medförde att par 2 delade box med par 16, par 18 delade box med par 14 samt den vaccinerade grisen ur par 15, par 17 delade box med kontrollgrisen ur par 15. Övriga par behölls intakta i egna boxar.

Vid undersökningstillfället 2010-10-20, tre veckor efter flytt till tillväxtavdelningen, hade en av försöksgrisarna dött (vaccingris 14). I boxarna

sågs ett flertal grisar med diarré och lös avföring. Bland de grisar som ingick i försöket noterades diarré på tre grisar, varav två vaccinerade (10 och 12), och en kontrollgris (16). Halvfast till lös avföring sågs på 13 grisar, varav sex vaccinerade (3, 4, 5, 11, 16, 17), och sju från kontrollgruppen (1, 4, 8, 10, 11, 12, 17). Övriga iakttagelser vid detta tillfälle var att kontrollgrisen i par 14 hade en böld på vänster kind.

Vid sista provtagningen, 2010-11-10, hade ytterligare en försöksgris dött (kontrollgris 12). Diarré sågs i flera boxar, många kullar hade generellt ojämn tillväxt och minskad kullstorlek, detta var mest påtagligt i boxen för par 12. Bland grisarna som ingick i försöket noterades vattentunn diarré hos en gris ur kontrollgruppen (11). Några få försöksgrisar hade halvfast till lös avföring, varav en från vaccinationsgruppen (4), och fyra från kontrollgruppen (4, 14, 15, 17). Övriga iakttagelser vid detta tillfälle var ett navelbräck på den vaccinerade grisen i par 11.

Diarréförekomsten bland grisarna vid de tre sista provtagningstillfällena redovisas i tabell 4, tillsammans med provresultaten. Då en generell treveckors-diarré förekom bland grisarna vid första och andra provtagningen redovisas inga individuella avvikelser under dessa tillfällen, då avföringen generellt var något lösare hos samtliga försöksgrisar.

Dödlighet

En gris från varje grupp dog under försöket. Detta ger en mortalitet på 5,6 % i vardera gruppen.

Den vaccinerade grisen i par 14 dog strax efter flytt till tillväxavdelningen. Vid provtagningen innan flytten observerades att grisen var liten och mager och hade vattentunn diarré. Denna gris utsöndrade ingen *Lawsonia* i faeces och hade inte heller bildat några antikroppar vid sin sista provtagning. Den kvarvarande grisen ur detta par var en av de två grisar med sämst tillväxt av alla i kontrollgruppen, se figur 3 nedan.

Den gris som dog ur kontrollgruppen (par 12), dog under perioden mellan tre och sex veckor efter flytten till tillväxten. Den hade vid sin sista provtagning vattentunn diarré och visade sig vara positiv på både PCR och serologi. Vid första undersökningstillfället noterades en klövinfektion på höger bakben. Den kvarvarande vaccinerade grisen ur detta par hade sämst tillväxt av alla i vaccinationsgruppen, se figur 3 nedan.

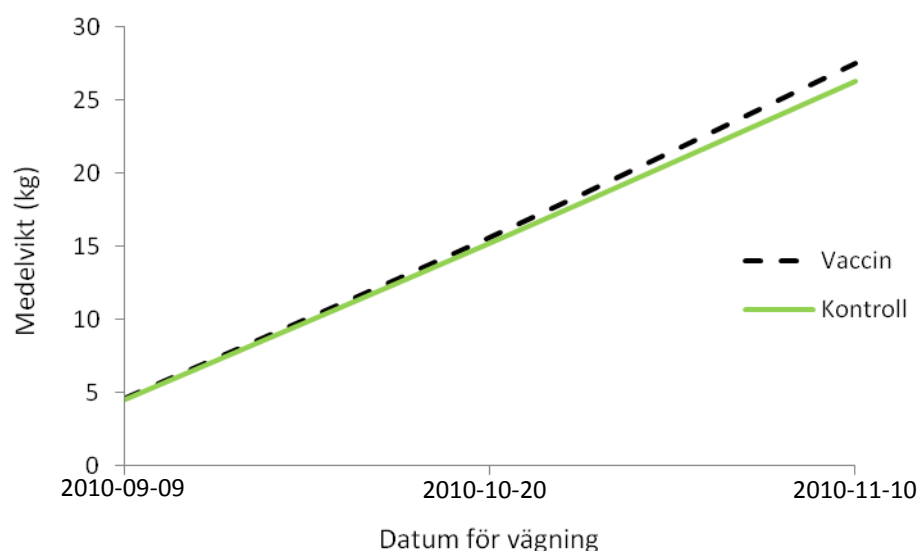
Vikt

Samtliga grisar vägdes vid tre tillfällen, se tabell 2.

Tabell 2. Förteckning över samtliga grisars individuella vikt vid de tre olika vägningstillfällena

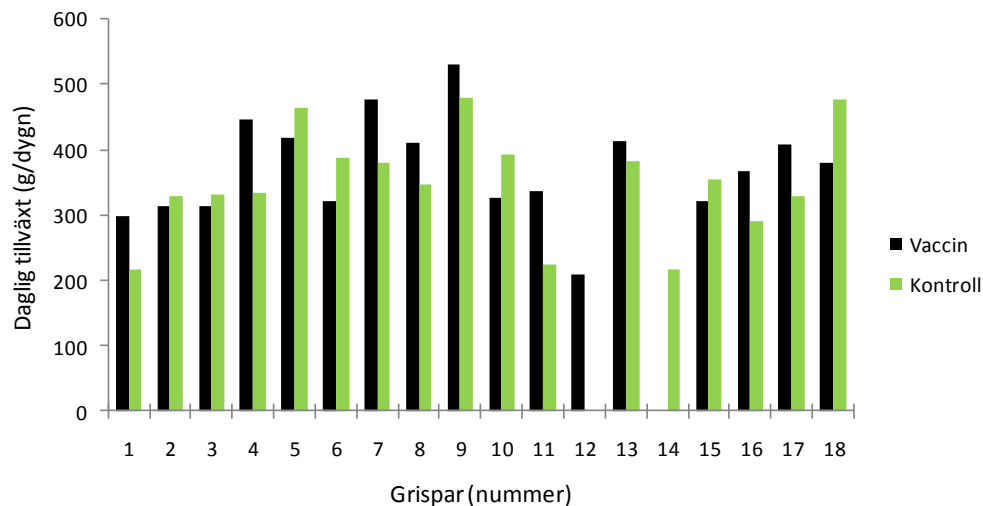
Vaccingrupp				Kontrollgrupp			
Gris nr	Vikt			Gris nr	Vikt		
	2010-09-09	2010-10-20	2010-11-10		2010-09-09	2010-10-20	2010-11-10
1	5,5	12	24	1	5,5	16	19
2	3,6	15	23	2	3,6	8	24
3	4,6	15	24	3	4,5	12,5	25
4	4,4	18	32	4	4,3	11,5	25
5	5,1	16,5	31	5	5,2	15	34
6	5,1	8	25	6	5	16	29
7	4,4	21	34	7	4,4	18	28
8	4,5	17,5	30	8	4,5	17	26
9	5,1	20	38	9	5,2	21	35
10	5,7	17	26	10	5,7	16,5	30
11	4,2	13	25	11	4,1	12	18
12	3,1	11,5	16	12	3,1	9	
13	4,4	16	30	13	4,3	16	28
14	4,2			14	4,5	12	18
15	4,1	15,5	24	15	4	16	26
16	5,2	14	28	16	5	16	23
17	3,7	16,5	29	17	3,6	18	24
18	5,5	19	29	18	5,4	24	35

Vid varje tillfälle beräknades medelvikten bland grisarna i de två grupperna, se figur 2. Vid försökets start, 2010-09-09, var medelvikten bland grisarna i vaccingruppen 4,58 kg (3,1–5,7 kg), och i kontrollgruppen 4,55 kg (3,1–5,7 kg). Vid vägning tre veckor efter insättning i tillväxtavdelningen, 2010-10-20, var medelvikten i vaccingruppen 15,6 kg (8–20 kg), och i kontrollgruppen 15,3 kg (8–24 kg). Vid försökets slut, 2010-11-10, var medelvikten i vaccingruppen 27,5 kg (16–38 kg), och i kontrollgruppen 26,3 kg (18–35 kg).



Figur 2. Medelvikt i grupperna vid tre vägningstillfällen.

Den dagliga tillväxten under de 62 dagar som försöket pågick beräknades i de två grupperna. Medeltillväxten bland grisarna i vaccingruppen beräknades till 370 g/dygn (208-531 g/dygn). Bland grisarna i kontrollgruppen var motsvarande värde 350 g/dygn (218-481 g/dygn). I figur 3 ses den dagliga tillväxten för varje enskild gris.



Figur 3. Genomsnittlig daglig tillväxt hos samtliga grisar i försöket.

Skillnaden mellan de två gruppernas medelvärde i daglig tillväxt beräknades genom användning av ett dubbelsidigt t-test. Det beräknade p-värdet för testet beräknades till 0,46, vilket innebär att det inte förekommer någon statistisk signifikans i skillnaden mellan grupperna avseende daglig tillväxt.

Provtagningsresultat

Samtliga individuella provresultat i vardera gruppen presenteras i tabell 4.

Faeces

Samtliga preparerade faecesprov analyserades minst två gånger med realtids PCR. I de fall där resultaten var tveksamma har ytterligare körningar gjorts för att få ett så tillförlitligt resultat som möjligt. I några få fall var provresultaten svårtolkade då de var svagt positiva, dvs. hade ett mycket högt Ct-värde. Dessa har i slutändan bedömts som positiva om de uppvisat samma resultat efter flera körningar. Se resultat i tabell 3.

Tabell 3. Antal positiva resultat avseende utsöndrande av *Lawsonia intracellularis* i faeces, efter samtliga provtagningsstillfällen

Provtagningsstillfälle	Antal positiva faeces (PCR)	
	Vaccingrupp	Kontrollgrupp
1	0 (0 %)	1 (5,6 %) *
2	0 (0 %)	0 (0 %)
3	0 (0 %)	0 (0 %)
4	3 (17,6 %) *	2 (11,1 %)
5	16 (94,1 %) *	12 (70,1 %) *

* Vid detta provtagningsstillfälle var totalantalet grisar i gruppen 17 st.

Serologi

Samtliga blodprover analyserades i duplikat med blocking ELISA vid ett och samma tillfälle. Se resultat i tabell 4.

Tabell 4. Antal positiva resultat avseende antikroppsbildning mot *Lawsonia intracellularis* efter samtliga provtagningsstillfällen. Observera att vid provtagningsstillfälle 2 togs enbart faecesprov, därav inga resultat för serologi

Provtagningsstillfälle	Antal positiva serologi (ELISA)	
	Vaccingrupp	Kontrollgrupp
1	3 (16,7 %)	7 (38,9 %)
2	—	—
3	1 (5,6 %)	3 (16,7 %)
4	1 (5,9 %) *	3 (16,7 %)
5	8 (47,1 %) *	10 (58,8 %) *

* Vid detta provtagningsstillfälle var totalantalet grisar i gruppen 17 st.

Tabell 5. Förteckning över samtliga grisars individuella provsvar vid de olika provtagningstillfällena. Vid provtagning 3-5 redovisas även diarréförekomst (*) bland försöksgrisarna, där diarré i detta fall definieras som olika grad av lös avföring med avsaknad av formbar konsistens

Vaccingrupp

Gris nr	1		2	3		4		5	
	PCR	ELISA	PCR	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA
1	-	-	-	-	-	-	-	X	X
2	-	-	-	-	-	-	-	X	-
3	-	-	-	-	-	-*	-	X	X
4	-	-	-	-	-	-*	-	X*	X
5	-	-	-	-	-	X*	-	X	X
6	-	-	-	-	-	-	X	X	X
7	-	-	-	-	-	-	-	X	-
8	-	-	-	-	-	X	-	X	X
9	-	-	-	-	-	-	-	X	-
10	-	X	-	-	-	-*	-	X	X
11	-	-	-	-	-	-*	-	X	-
12	-	X	-	-	-	X*	-	X	-
13	-	-	-	-	-	-	-	X	-
14	-	-	-	-*	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	X	X
16	-	-	-	-	-	-*	-	X	-
17	-	-	-	-	-	-*	-	-	-
18	-	X	-	-	X	-	-	X	-

Kontrollgrupp

Gris nr	1		2	3		4		5	
	PCR	ELISA	PCR	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA
1	X	X	-	-	X	-*	X	X	X
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	X	-	-	-	-	-	X	-
4	-	-	-	-	-	-*	-	X*	X
5	-	-	-	-	-	-	-	X	X
6	-	-	-	-	-	-	-	X	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-*	-	-	X
9	-	-	-	-	-	X	-	X	X
10	-	X	-	-	-	-*	-	-	X
11	-	X	-	-	X	-*	X	X*	X
12	-	X	-	-	-	X*	X	-	-
13	-	X	-	-	-	-	-	X	X
14	-	-	-	-	-	-	-	X*	-
15	-	X	-	-	-	-	-	X*	X
16	-	-	-	-	-	-*	-	-	-
17	-	-	-	-	X	-*	-	X*	X
18	-	-	-	-	-	-	-	X	-

X: positivt prov

-: negativt prov

*: diarréförekomst

DISKUSSION

Hälsoläget

Vid det första provtagningstillfället i tillväxtavdelningen tre veckor efter insättning, sågs en ökad diarréförekomst i boxarna. Vanlig avvänjningsdiarré som uppkommer i direkt anslutning till avvänjningen kan därmed uteslutas och ses som en mindre trolig orsak till diarrén vid denna tidpunkt. Då det sedan tidigare är känt att *Lawsonia intracellularis* förekommer i tillväxtavdelningen samt att sjukdomen oftast ses tre-fyra veckor efter avvänjning, kan misstanke om *Lawsonia*-orsakad diarré anses högst trolig. Av de totalt 16 grisar som hade lösare avföring än normalt, fanns sex hela försökspar representerade. Detta tolkar jag som att en aktiv smitta pågår i flera olika boxar och att risken för att utveckla diarré är likvärdig inom flera par oavsett vaccinationsstatus. Andelen diarrégrisar var dock något högre i vaccinationsgruppen (47 %) jämfört med kontrollgruppen (44 %).

Efter sex veckors vistelse i tillväxtavdelningen hade antalet försöksgrisar med diarré minskat, framförallt i vaccinationsgruppen. Fortfarande sågs en relativt frekvent förekomst av diarré i boxarna, och en generell, ojämn storleksvariation och minskad kullstorlek kunde också observeras. Av de totalt sex försöksgrisarna med lösare avföring, fanns en gris från vaccinationsgruppen och fem kontrollgrisar. Bland dessa fanns ett helt försökspar representerat och två av de andra grisarna delade samma box. Detta tyder på att smittan är olika hög i olika boxar, samt att olika individer och par har olika känslighet.

Det allmänna hälsoläget i besättningen med ojämn kullstorlekar, ojämn tillväxt och diarréförekomst samt tidigare känd infektionsstatus avseende *Lawsonia intracellularis*, talar för en pågående *Lawsonia*-problematik i tillväxtavdelningen. Denna generella bedömning är dock en uppskattad ögonblicksbild vilket inte helt kan säkerställas, då bara de grisar som ingick i försöket undersöktes närmare, provtogs och vägdes. Ingen större skillnad kunde påvisas gällande allmän hälsostatus i de olika grupperna, bortsett från den något högre diarréförekomsten bland vaccingrisarna efter tre veckor i tillväxten, samt motsvarande bland kontrollgrisarna vid försökets slut. Detta talar både för och emot de tidigare studier som visat på en tydlig skillnad gällande hälsostatus mellan vaccinerade och ovaccinerade grisar (Hardge *et al.*, 2004, Kolb *et al.*, 2004, Kroll *et al.*, 2004c, Bulay *et al.*, 2006, Henke *et al.*, 2006, Kritas *et al.*, 2006, McOrist & Smits, 2006, Steinheuer *et al.*, 2006, Voets *et al.*, 2006, Yamaguchi *et al.*, 2006).

Inget tyder på att användandet av vaccinet i sig skulle ha en negativ inverkan på de vaccinerade grisarnas hälsa, och därmed har inga oönskade bieffekter av vaccinet kunnat konstateras, vilket talar för att det är säkert att använda.

Generell storleksspridning i kullarna kan givetvis orsakas av andra sjukdomar och lidanden som påverkar tillväxt hos växande grisar (t.ex. PMWS). Då fokus legat på just *Lawsonia* har andra tänkbara orsaker inte beaktats vidare i denna studie.

Den treveckors-diarré som sågs i grisningsomgången vid försökets start ses mer eller mindre i de flesta svenska smågrisproducerande svinbesättningar, och är därmed att betrakta som ett normalfynd, utan misstanke om *Lawsonia* som

bakomliggande orsak. De negativa PCR-resultaten (med ett undantag) från försökets start talar inte heller för att *Lawsonia intracellularis* skulle vara ett problem vid denna tidpunkt.

För att uppnå en korrekt biosäkerhet i en besättning bör man undvika överbeläggning. Detta var dessvärre fallet i denna omgång, där några kullar hystes in i en annan grisningsavdelning under de första veckorna för att sedan förflyttas till en annan, tillfällig byggnad. Detta påverkar "tomtid" och renlighet i grisningsavdelningen, vilket ger en ökad risk för smågrisarna i kommande grisningsomgång men det kan även bidra till en ökad hälsorisk för de djur som tvingas flytta och byta miljö. Det går inte att utesluta, att detta var en bidragande orsak till att en gris (nr 14) i vaccingruppen dog.

Dödlighet

Ingen skillnad i mortalitet sågs mellan grupperna då antalet dödsfall var lika i båda grupper. Detta stödjer inte tidigare studier som talar för att vaccinerade djur har en lägre mortalitet än ovaccinerade djur (Hardge *et al.*, 2004, Kolb *et al.*, 2004, Kroll *et al.*, 2004c, Bulay *et al.*, 2006, Henke *et al.*, 2006, Kritas *et al.*, 2006, McOrist & Smits, 2006, Steinheuer *et al.*, 2006, Voets *et al.*, 2006, Yamaguchi *et al.*, 2006). Mortaliteten på 5,6 % i försöket ligger något över den i litteraturen beskrivna dödligheten orsakad av *Lawsonia intracellularis*, 1-5 % (Winkelman & Dee, 1996), och är högre än den genomsnittliga dödligheten (2,3 %) hos svenska tillväxtgrisar. För att få en mer rättvis och tillförlitlig siffra på mortaliteten skulle en större studie där fler grisar ingick vara önskvärt. Trots att bara en enda gris i vardera gruppen dog under försökstiden, var dödlighetsprocenten genast uppe på 5,6 % då totalantalet grisar i detta fall bara var 18 stycken.

Den gris ur vaccinationsgruppen (14) som dog under försöket var i dåligt skick vid det tredje provtagningsstillfället och dog strax efter insättning i tillväxtavdelningen. Denna gris tillhörde den kull som fick konkurrens av par 18 i grisningsboxen. Vid försökets början vägde par 18 cirka 1 kg mer. En möjlig teori är att dessa större smågrisar trängde undan de mindre, vilka fick sämre möjligheter att dia och därmed blev nedsatta och känsligare för infektioner. Den drabbade grisen utsöndrade ingen *Lawsonia* i faeces och hade inte heller bildat några antikroppar vid sin sista provtagning. Med tanke på dessa resultat samt att grisen var svag redan innan den förflyttats till tillväxten kan man misstänka att grisen dog av annan anledning än *Lawsonia*. Det kan även vara så att den nedsatta grisen var extra känslig vid förflyttningen och att det var den faktor som fick den att "tippa över kanten" av till exempel avvänjningsdiarré eller *Lawsonia*-infektion. En intressant notering är att den kvarvarande grisen i par 14 var en av de två grisar som hade sämst tillväxt av alla i kontrollgruppen.

Liknande resultat avseende tillväxten sågs även i det par som den andra döda grisen i försöket tillhörde. Kontrollgrisen i par 12 dog mellan de två sista provtagningsstillfällena, dvs. mellan tre till sex veckors vistelse i tillväxtavdelningen. Den hade vid sitt sista provtagningsstillfälle diarré och var då positiv för *Lawsonia* på både PCR och serologi, vilket talar för att en trolig dödsorsak skulle kunna vara *Lawsonia*. Denna gris hade även antikroppar vid den

första provtagningen, men inte vid andra vilket kan antyda förekomst av maternella antikroppar. Även den vaccinerade grisen i par 12 hade antikroppar vid försökets start, vilket stärker misstanken om maternella antikroppar hos detta syskonpar. Den vaccinerade grisen i paret utsöndrade också *Lawsonia* i faeces vid fjärde provtagningen samt vid sista provtagningstillfället, men hade ännu inte serokonverterat vid försökets slut. Även i detta fall hade den kvarvarande grisen ur detta par den sämsta tillväxten, denna gång i vaccinationsgruppen.

Inga obduktioner utfördes av de döda grisarna, vilket hade varit önskvärt för att kunna utvärdera dödsorsak och studera eventuella tarmförändringar orsakade av *Lawsonia intracellularis*. Som diskuterats ovan skulle det kunna vara så att den döda kontrollgrisen faktiskt dog pga. en *Lawsonia*-infektion medan den döda vaccinationsgrisen dog av annan anledning, alternativt så dog båda dessa grisar av *Lawsonia*, eller också - ingen alls. Olika orsaker till dödsfallen skulle i så fall kunna ge olika värden på "sann *Lawsonia*-orsakad dödlighet". Utan att helt säkert veta dödsorsaken kan det bara spekuleras om vad som är sant.

Vikt och tillväxt

Vid försökets början var skillnaden i medelvikt mellan grupperna nästintill densamma (vaccingruppen 4,58 kg och kontrollgruppen 4,55 kg). Denna minimala skillnad är försumbar och måste bedömas som acceptabel då det var omöjligt att hitta par av grisar av samma kön med exakt samma vikt i varje kull. Här kan även nämnas att om en jämn könsfördelning hade varit av högsta prioritet så hade istället skillnaden i vikt mellan grupperna varit betydligt mer påtaglig.

Vid andra vägningstillfället var skillnaden i medelvikt mellan grupperna 0,3 kg till vaccingruppens fördel (vaccingruppen 15,6 kg och kontrollgruppen 15,3 kg). Vid försökets slut hade den vaccinerade gruppen visserligen en högre medelvikt (27,5 kg) jämfört med kontrollgruppen (26,3 kg). Däremot var storleksvariationen mellan alla grisar inom gruppen större i vaccinationsgruppen (22 kg, från 16 till 38 kg), jämfört med kontrollgruppen (17 kg; från 18 till 35 kg).

Enligt vaccintillverkaren ska fältförsök ha visat en genomsnittlig ökad tillväxt på upp till 30 g/dygn mellan vaccinerade och icke vaccinerade grisar. I detta försök var skillnaden visserligen 20 g/dygn (vaccingruppen 370 g/dygn och kontrollgruppen 350 g/dygn), men denna skillnad var inte statistiskt signifikant. Här sågs även en större tillväxtvariation mellan grisarna i vaccingruppen, 323; 208-531 g/dygn, jämfört med kontrollgruppens 263; 218-481 g/dygn.

Dessa resultat gällande vikt och tillväxt stämmer inte överens med flera tidigare studier där högre tillväxt och en mindre variation i både tillväxt och storlek, lyfts fram som positiva faktorer vid användande av Enterisol® Ileitis vet. (Hardge *et al.*, 2004, Kolb *et al.*, 2004, Kroll *et al.*, 2004c, Bulay *et al.*, 2006, Henke *et al.*, 2006, Kritas *et al.*, 2006, McOrist & Smits, 2006, Steinheuer *et al.*, 2006, Voets *et al.*, 2006, Yamaguchi *et al.*, 2006).

Om man istället hade följt grisarna under en längre period, t.ex. hela vägen fram till slakt, skulle man eventuellt kunna se en mer signifikant skillnad i tillväxt mellan grupperna, till vaccinets fördel. En större skillnad i medelvikt sågs mellan

andra och tredje vägningstillfället, jämfört med första och andra. Om denna trend skulle hålla i sig skulle det betyda att vaccinationsgruppen skulle dra ifrån kontrollgruppen ytterligare med tiden. De tarmskador som uppstår vid infektionen av *Lawsonia* i tillväxtavdelningen har en inverkan på näringsupptaget även på sikt, en okomplicerad PIA läker t.ex. av på 2-3 månader. Detta talar för att de vaccinerade djuren skulle växa bättre.

De två olika vågarna som användes under försöket hade en viss skillnad i delning. Detta medförde att första vikten som togs med fjädervåg (delning 0,1 kg) troligen blev något mer exakt än de andra vikterna som togs med personvåg (delning 0,5 kg). Att detta skulle göra någon större skillnad på slutlig vikt och tillväxt är dock inte troligt, då samma våg användes för samtliga grisar vid samma tillfällen. Även om mellan- och slutvikten är mindre exakt än startvikten, är skillnaden däremellan ändå den samma för alla grisar.

Resultat provtagningar

Efter tre veckors vistelse i tillväxtavdelningen var tre av de vaccinerade grisarna positiva på PCR. Två av de tre PCR-positiva grisarna liksom sex andra vaccingrisar (totalt 47 %) hade diarré vid provtagningstillfället. Detta gör att effekten av vaccinet kan ifrågasättas. Hur kan vi med säkerhet veta att diarrén inte orsakas av en aktiv *Lawsonia*-infektion? Vid samma tillfälle var det två grisar i kontrollgruppen som var PCR-positiva. Av dessa hade en gris diarré, vilket även sju andra kontrollgrisar hade, totalt åtta stycken (44 %). Trots att PCR-reaktionen har hög sensitivitet för *Lawsonia* är det bara de grisar som utsöndrar en tillräckligt stor bakteriemängd och har en viss grad av tarmlesioner som kan detekteras med PCR och som får positiva resultat. Dessutom utsöndras bakterien intermittent. Detta tror jag kan vara en förklaring till att många grisar med diarré ännu inte hunnit bli positiva på PCR vid detta provtagningstillfälle. Det kan även röra sig om diarré orsakad av annan orsak än *Lawsonia*, t.ex. sen avvänjningsdiarré eller spiroketal diarré. Detta skulle kräva utökad provtagning för att bekräfta.

Vid försökets slut utsöndrade alla utom en av de vaccinerade grisarna *Lawsonia intracellularis* i faeces (94 %). Lös avföring sågs nu bara hos en av vaccinationsgrisarna (5,9 %). I kontrollgruppen utsöndrade merparten av grisarna (71 %) *Lawsonia* i faeces vid sista provtagningen. Av dessa hade åtta grisar även en positiv antikroppstiter. Två grisar hade detekterbara antikroppar men utsöndrade inte bakterien i avföringen varken vid detta eller tidigare provtagningstillfälle.

Enligt en utvärdering av den använda blocking ELISA-metoden för att identifiera antikroppar mot *Lawsonia intracellularis* har testet en sensitivitet på 72 % och en specificitet på 93 %. Detta innebär att 72 % av de grisar som har antikroppar identifieras och av de som inte har några antikroppar upptäcks 93 %. Testets positiva prediktiva värde är beräknat till 0,82 vilket ger en sannolikhet på att 82 % av de som testas positiva för antikroppar mot *Lawsonia* verkligen är sant positiva. Det negativa prediktiva värdet är beräknat till 0,89, vilket innebär att 89 % av de som testas negativa är sant negativa (Jacobson *et al.*, 2010c). Detta betyder att man statistiskt sett kan förvänta sig 18 % falskt positiva och 11 % falskt negativa provsvar vid analysen. Vid första provtagningen i försöket betyder detta att

möjligheten finns att 0,5 är falskt positiva och 1,7 är falskt negativa bland de vaccinerade grisarna samt att 1,3 är falskt positiva och 1,2 är falskt negativa bland kontrollgrisarna. Detta skulle kunna ge ett något förändrat sant resultat, men troligtvis inte i sådan utsträckning att alla prover skulle vara negativa.

Vid försökets start testades inte mindre än tio av smågrisarna positiva för antikroppar mot *Lawsonia intracellularis*. Detta skulle kunna tala för att de fått i sig maternella antikroppar via saggans råmjölk. I två av paren kan ett samband ses där båda grisarna hade antikroppar från början vilket känns realistiskt då de diar från samma sugga och teoretiskt sett borde få i sig samma råmjölk och därmed samma antikroppar från saggan. I de flesta av fallen däremot, var det bara en av grisarna i paret som hade detekterbara antikroppar från början. Eftersom alla smågrisar i en kull diar från olika spenar och råmjölksutsöndringen inte alltid är perfekt i alla juverdelar är det teoretiskt möjligt att förekomst av maternella antikroppar kan variera inom en kull. Kontroll av råmjölk och juver eller provtagning av suggor ingick inte heller i detta försök. Förekomst av maternella antikroppar mot *Lawsonia intracellularis* är i stort sett inte studerat och behöver utredas närmare (Jensen *et al.*, 2005). Det är däremot känt från en tidigare vaccinstudie att välvaccinerade suggor kan överföra en viss maternell immunitet mot *Lawsonia intracellularis* till sina smågrisar, vilken i genomsnitt varade under de 42 första levnadsdagarna. Enligt en annan studie har man dessutom fått indikationer på att gyltor och suggor troligtvis kan ha en kvarvarande immunitet mot *Lawsonia* längre än 3,5 år efter vaccinering (Sanford, 2006). Då antikroppssvaret anses vara lika starkt oavsett om en gris utsätts för smittan eller vaccineras mot den (Nathues *et al.*, 2004), skulle eventuellt även den långa varaktigheten och den överförbara maternella immuniteten från vaccinerade suggor vara applicerbar på suggor som utsätts för smittan. Enligt resultatet i denna studie är en sådan teori inte helt att förkasta då mycket tyder på att tio av smågrisarna i försöket (28 %) hade fått maternell immunitet mot *Lawsonia intracellularis* via råmjölken. Trots att 1,8 av de tio positiva provsvaren kan vara att betrakta som falskt positiva, kvarstår ändå en stor mängd statistiskt sett sant positiva resultat.

Om även varaktigheten för de maternella antikropparna skulle vara överförbar från den ovan nämnda vaccinstudien, skulle en fortsatt positiv antikroppstiter hos vissa av smågrisarna kunna vara att förvänta även vid nästa provtagningstillfälle, tre veckor senare, då grisarna var omkring 35 dagar gamla. Det skulle i så fall kunna förklara att tre av de tio grisar i försöket som hade antikroppar vid första provtagningstillfället, fortfarande hade en positiv titer vid nästa blodprovstagning. Av dessa var en gris från vaccinationsgruppen och två från kontrollgruppen.

I vaccinationsgruppen hade tre grisar antikroppar mot *Lawsonia* innan vaccinering. Två av dessa var negativa vid nästa provtagning tre veckor senare, medan en av dem var positiv även vid detta tillfälle för att sedan vara negativ nästa gång. Detta resultat anser jag skulle kunna förklaras av en maternell immunitet.

I kontrollgruppen hade sju smågrisar antikroppar mot *Lawsonia* vid försökets början, vilket troligen skulle kunna vara maternella antikroppar. Två av dessa hade detekterbara antikroppar mot *Lawsonia intracellularis* vid samtliga

provtagningar. En av dessa grisar visade sig även oväntat vara PCR-positiv vid försökets början, vilket gör den mer intressant. Vaccingrisarna i dessa två respektive par var däremot negativa för antikroppar under denna tid.

Ett riskmoment vid första provtagningen och vaccineringen var att inget handskebyte skedde innan hantering av varje ny gris. Handsken kan ha kontaminerats med vaccin som sedan kunnat ge falskt positivt svar på PCR för nästa kontrollgris. PCR-analysen kan inte skilja på *Lawsonia* från vaccin eller från naturlig infektion. Risken för detta ökade då mängden faeces i de flesta fall var mycket liten vid första provtagningarna och därmed var det svårt att få ett representativt ”mittprov” som inte hade kontakt med plasten i handsken. Detta misstänktes då en av kontrollgrisarna var oväntat positiv på PCR vid samtliga tre körningar av första provtagningsomgången. Eftersom denna gris tillhörde par 1 som dessutom var först ut att provtas kan man även tänka sig att risken att spilla vaccin på handsken var som störst i början innan man hade fått in vanan att hantera drenchen ordentligt. För att mer säkert kunna misstänka en vaccinkontaminering vid detta tillfälle hade en ny preparering av faeces med ett ”mittprov” varit önskvärt, men då inget extra faeces fanns att tillgå var detta inte möjligt.

Att samma gris var negativ för PCR dagen efter vaccinering skulle kunna stärka misstanken om att det positiva resultatet dagen innan, kom från just en vaccinkontaminerad handske och inte från denna grisens faeces. Ovetskapen om vad som faktiskt gäller avseende maternella antikroppar mot *Lawsonia intracellularis* skulle kunna svara för de positiva antikroppsresultaten vid samtliga provtagningar hos två av kontrollgrisarna. Att de maternella antikropparna kvarstår längre hos dessa grisar skulle helt enkelt bara kunna röra sig om en individuell variation.

Den fortsatt positiva antikroppstitern i kombination med ett första positivt PCR-resultat talar dock för att det skulle kunna röra sig om en subkliniskt infekterad smågris som sprider smittan utan att själv uppvisa några direkta symtom. Det kan då tyckas att denna gris borde ha utsöndrat *Lawsonia* i avföringen även andra dagen om den var sant positiv. Å andra sidan kan utsöndringen av bakterien i faeces ske intermittent och dessutom vet man att PCR-analysen detekterar *Lawsonia* i en lägre frekvens i faecesprover tagna från subkliniskt infekterade djur (Jacobson *et al.*, 2004), vilket alltså skulle kunna vara fallet. Man vet även att ju yngre grisarna är när de infekteras av *Lawsonia intracellularis*, desto lindrigare blir symtomen (Winkelman & Dee, 1996). Bland subkliniskt infekterade djur är försämrad tillväxt oftast det enda symtomet, och denna gris var en av de två grisar som hade den allra lägsta tillväxten i kontrollgruppen. Dessa faktorer bidrar till att jag misstänker att denna gris faktiskt mycket väl kan tänkas ha varit infekterad.

Om det är så att det förekommer subkliniska smittbärare redan i grisningsavdelningen är det en intressant upptäckt, då man tidigare bara sett smittan koncentrerad till tillväxtavdelningen. Hur smittan i så fall uppkommer här är oklart. Det skulle eventuellt kunna röra sig om suggor som fungerar som subkliniska smittbärare. Den gängse hypotesen är att enstaka suggor kan vara reservoarer i en besättning genom att agera symtomlösa smittbärare, och att

enstaka smågrisar i kullen sedan bär med sig infektionen till tillväxtavdelningen där smittan uppförkas och sprids bland övriga grisar (Jacobson, 2005).

Icke att förglömma är dock att de grisar som ingick i försöket bara var en liten del av den totala mängd grisar som fanns i grisningsavdelningen och tillväxtstallet under försökstiden. Övriga grisar provtogs eller kontrollerades inte. Hade samtliga smågrisar i grisningsomgången ingått i försöket hade man kanske fått en bättre sanning avseende förekomst av *Lawsonia* och subkliniska smittbärare redan i grisningsavdelningen. En utökad utredning med provtagning i besättningens grisningsavdelning vore intressant för att utvärdera misstanken om *Lawsonia*-förekomst redan innan tillväxtavdelningen.

Då samtliga grisar i försöket var negativa avseende PCR dagen efter vaccinationstillfället, kunde därmed ingen utsöndring av vaccinstammen i faeces konstateras bland de vaccinerade grisarna. Inte heller tycktes någon överföring av bakterien ha skett från vaccinerade till ovaccinerade grisar. Detta stämmer väl överens med resultatet från den amerikanska studien 2004 (Pelger *et al.*, 2004), och talar för att den mängd av bakterien som utsöndras dagen efter vaccinering är så låg att den hamnar under detektionsgränsen för vad PCR-analysen kan detektera. Man vet att en viss del av antigenet måste absorberas in i enterocyterna för att kunna orsaka ett immunsvaret vid oral vaccinering.

I vaccinationsgruppen ses den första positiva antikroppstitern hos en av grisarna (5,9 %), först vid fjärde provtagningen, sex veckor efter vaccinationstillfället. Vid sista provtagningen, nio veckor efter vaccinationstillfället, har totalt åtta grisar bildat antikroppar mot *Lawsonia intracellularis* (47,1 %). Dessa resultat tyder på en fördröjd serokonvertering vilket stämmer överens med tidigare studier. Att utvärdera effekten av ett positivt antikropsresultat bland de vaccinerade grisarna är komplext då serokonvertering enligt vaccintillverkaren inte alltid kan påvisas och inte heller sägs vara nödvändigt för ett fullgott skydd mot *Lawsonia*. Enligt vaccintillverkaren utlovas ett fullgott skydd mot *Lawsonia*-infektion, tre veckor efter vaccinering, oavsett vad antikropsresultaten visar.

De positiva PCR-resultaten bland de vaccinerade grisarna i tillväxtavdelningen kan diskuteras. Mest troligt anser jag det vara att detta är ett resultat av naturlig infektion av *Lawsonia intracellularis* pga. det höga smittrycket som råder i tillväxtavdelningen. Inga tidigare studier tyder på att vaccinerade grisar skulle utsöndra vaccinstammen i avföringen så lång tid efter vaccinering. Även de vaccinerade grisarna får i sig smittämnet, men med ett fullgott vaccinationsskydd skall bakterien avdödas för att sedan urskiljas i fekalierna. PCR-analysen kan sedan som bekant inte särskilja levande bakterier från vaccinstam. Det kan även spekuleras i huruvida den naturliga infektion som grisarna utsätts för kan tänkas ge en boostereffekt av vaccinet och därmed stimulera till ökad och påskyndad antikropsbildning. Inte heller serologiska tester kan särskilja huruvida serokonvertering skett pga. vaccination eller som svar på en naturlig infektion.

Serokonverteringen tycks vara mindre fördröjd i kontrollgruppen jämfört med vaccinationsgruppen. Här är många av grisarna positiva för första gången vid försökets slut, både vad gäller antikroppar och fekal utsöndring av bakterien. Vissa av grisarna har bildat antikroppar vid detta tillfälle, utan att ha uppvisat ett

positivt PCR-resultat vid något tillfälle. Tidigare studier har visat att grisar som utsätts för smittan ofta har detekterbara antikroppar mellan en och tre veckor efter smittotillfället (Guedes & Gebhart, 2003). Då man tidigare även visat att intervallet mellan utsöndring av bakterien i faeces och påvisande av antikroppar i serum kan variera mellan noll till sex veckor (Jacobson *et al.*, 2010a), talar mycket för att flertalet grisar kan ha utsöndrat *Lawsonia* i faeces någon gång mellan provtagningarna, då tiden däremellan är tre veckor.

Konklusion

Enlig resultaten av denna studie ger vaccinet i sig inte upphov till så många positiva faktorer som skulle vara önskvärt för att det skulle anses fördelaktigt att använda i svenska besättningar. Inga resultat tyder på att användandet av vaccinet skulle orsaka några negativa bieffekter, men dessvärre har några större positiva effekter inte heller kunnat visas. Ingen signifikant ökad skillnad i daglig tillväxt har konstaterats. Dessutom förekom en stor variation i tillväxt och storlek. Vaccinet har inte heller visat sig ge en avsevärt förbättrad hälsostatus eller sänkt mortalitet. Det är dessutom svårvärderat huruvida vaccinet verkligen ger ett fullgott skydd mot *Lawsonia intracellularis*, då antikroppssvaret är fördröjt och i vissa fall helt uteblivet. Troligen skulle en längre försöksperiod kunna vara av värde för att bättre bedöma vaccinets effekter på sikt, t.ex. tillväxt och serokonvertering. Foderkonsumtionen bland grisarna är en faktor som skulle vara intressant att jämföra mot den dagliga tillväxten, och på så sätt få en mer korrekt bedömning av den ekonomiska lönsamheten av att vaccinera.

För att helt kunna utvärdera vaccinets effekt skulle en större studie vara önskvärd. Man skulle t.ex. kunna utöka studien genom att låta samtliga grisar i en hel grisningsomgång ingå. Ett sådant försöksupplägg hade dock medfört en större viktsvariation vid försökets start, vilket skulle ha försvårat bedömningen av eventuella effekter på grisarnas tillväxt. Å andra sidan ser vi nu kanske bara toppen på isberget då de grisar som ingått i försöket bara är ett fåtal av alla individer som funnits runtomkring och ändå kunnat påverka resultatet. Kanske är det svårt att göra vaccinet rättvisa då antalet ovaccinerade grisar är så pass stor i jämförelse. Det går inte att med säkerhet säga att detta resultat är representativt för just denna grisningsomgång när inte alla djur testats, men det ger en indikation på hur det fungerar vid jämförelse med en kontrollgrupp med samma grundförutsättningar.

TACK

Jag vill rikta ett stort tack till ägare och personal på gården som gjorde detta projekt genomförbart.

Tack till Ulf Emanuelsson för statistikhjälp och Maja Persson på SVA för hjälp med blodprovsanalyserna.

Sist men inte minst vill jag tacka min fantastiska handledare Magdalena Jacobson för all hjälp och engagemang under arbetets gång. Magda är inte bara otroligt professionell inom grisforskningen, hon är dessutom även världsmästare i grisbrottnings!

Jennifer Andersson, Uppsala. December 2010

LITTERATURFÖRTECKNING

- Biester, E; Schwarte, L. 1931. Intestinal adenoma in swine. *Am J Pathol*, 1931, 7, 175-185.
- Boesen, H.T; Jensen, T.K; Schmidt, A.S; Jensen, B.B; Jensen, S.M; Möller, K. 2004. The influence of diet on *Lawsonia intracellularis* colonization in pigs upon experimental challenge. *Veterinary Microbiology*, 103, 35-45.
- Bronsvoort, M; Norby, B; Bane, D.P; Gardner I.A. 2001. Management factors associated with seropositivity to *Lawsonia intracellularis* in US swine herds. *Journal of Swine Health and Production*, 9, 285-290.
- Bulay, A.C; Maala, C.U; Lising, R.T; Voets, H. 2006. Field efficacy of Enterisol ileitis vaccine in a Philippine commercial farm. *Proceedings of the 19th IPVS Congress*, Copenhagen, Denmark, 2006, 2, 200.
- Collins, A; Love, R.J; Pozo, J; Smith, S.H; McOrist, S. 2000. Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Swine Health and Production* 8, 211-215.
- Collins, A. M; Dijk, M; Vu, N. Q; Pozo, J; Love, R. J. 2001. Immunity to *Lawsonia intracellularis*. *Proceedings of the 2001 Allen D. Leman Conference*, 115-120.
- Cooper, D.M., Gebhart, C.J. 1998. Comparative aspects of proliferative enteritis. *JAVMA*. 212: 9, 1446-1451.
- Diaz, E.F; Chevez, J.C. 2006. Evaluation of a protocol to control *Lawsonia intracellularis* using live vaccine in a farm in Mexico. *Proceedings of the 19th IPVS Congress*, Copenhagen, Denmark, 2006, 2, 198.
- Friedman, M; Bednár, V; Klimes, J; Smola, J; Mrlik, V; Literák, I. 2008. *Lawsonia intracellularis* in rodents from pig farms with the occurrence of porcine proliferative enteropathy. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 117-121.
- Friendship, R.M; Corzo, C.A; Dewey, C.E; Blackwell, T. 2005. The effect of porcine proliferative enteropathy on the introduction of gilts into recipient herds. *Journal of Swine Health and Production*, 13, 139-142.
- Goldsby, R. A; Kindt, T. J; Osborne, B. A. 2000. *Kuby immunology*. Janis Kuby, Publisher, New York, WH Freeman, ©2000.
- Guedes, R.M.C; Gebhart, C.J. 2003. Onset and duration of fecal shedding, cell mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary Microbiology*, 91, 135-145.
- Hardge, T; Nickoll, E; Grunert, H; Elbers, K; Langbein, U; Keller, C; Bleier, T; Pohlentz, J; Ohlinger, V.F; Schroeder, B. 2004. Ileitis (PIA) prevention by oral vaccination – efficacy in European farms. *Proceedings of the 18th IPVS Congress*, Hamburg, Germany, 2004, 2, 580.
- Henke, N; Gaumann, H; Gottschalk, F. 2006. Experiences with Enterisol Ileitis under field circumstances in Germany. *Proceedings of the 19th IPVS Congress*, Copenhagen, Denmark, 2006, 2, 203.

- Herbst, W; Hertrampf, B; Schmitt, T; Weiss, R; Baljer, G. 2003. Diagnostik von *Lawsonia intracellularis* mittels polymerasekettenreaktion (PCR) bei schweinen mit und ohne diarrhoea und anderen tierarten. Dtsch Tierärztl Wschr, 110, 361-364.
- Jacobson, M; Englund, S; Ballagi-Pordány, A. 2003. The use of a mimic to detect polymerase chain reaction-inhibitory factors in faeces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*. J. Vet. Diagn, Invest. 15, 268-273.
- Jacobson, M; Aspan, A; Heldtander Köningsson, M; Hård af Segerstad, C; Wallgren, P; Fellström C; Jensen-Waern, M; Gunnarsson, A. 2004. Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. Veterinary Microbiology, 102, 189-201.
- Jacobson, M; Gerth Löfstedt, M; Holmgren, N; Lundeheim, N; Fellström, C. 2005. The prevalence of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in swine herds and in the wild boar population. J. Vet. Med. B 52, 386-391.
- Jacobson, M. 2005. Proliferativ enteropati – en aktuell sjukdom med många frågetecken. Svensk Veterinärtidning, 2, 11-16
- Jacobson, M; Aspan, A; Nordengrahn, A; Lindberg, M; Wallgren P. 2010a. Monitoring of *Lawsonia intracellularis* in breeding herd gilts. Veterinary Microbiology, 142, 317-322.
- Jacobson, M; Fellström, C; Jensen-Waern, M. 2010b. Porcine proliferative enteropathy: An important disease with questions remaining to be solved. The Veterinary Journal, 184, 264-268.
- Jacobson, M; Wallgren, P; Nordengrahn, A; Merza, M; Emanuelson, U. 2010c. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis* in pig sera. *Submitted for publication.*
- Jensen, T.K; Vigre, H. Sørensen, V; Möller, K. 2005. Naturally acquired *Lawsonia intracellularis* infection in pigs studied from weaning to slaughter by indirect immunofluorescence antibody test and polymerase chain reaction on faeces. Research in Veterinary Science, 79, 93-98.
- Keïta, A; Westhoff, D; Pagot, E; Orveillon, F.X; Pommier, P. 2004. Field study into safety of Enterisol® Ileitis on a *Lawsonia intracellularis* positive French farm. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2004, 1, 273.
- Keller, C; Ohlinger, V.F; Voets, H. 2004. Stability of lyophilized Enterisol® Ileitis MLV in drinker water from European farms. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2004, 1, 273.
- Keller, C; Schoeder, H; Ohlinger, VF. 2006. A new blocking ELISA kit for the detection of antibodies specific to *Lawsonia intracellularis* in porcine blood samples. The 4th International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference, Oslo, Norway.
- Knittel, J. P; Jordan, D. M; Schwartz, K. J; Janke, B. H; Roof, M. B; McOrist, S; Harris, D. L. 1998. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs. American Journal of Veterinary Research, 59, 722-726.

- Kolb, J; Sick, F. 2004. Safety and reduction of infection with a live *Lawsonia* vaccine in a field setting. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2004, 1, 315.
- Kritas, S.K; Petridou, E; Alexopoulos, C; Hatzopoulou. 2006. Field efficacy of an oral administered attenuated vaccine against porcine proliferative enteropathy in a chronically infected farm. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006, 1, 85.
- Kroll, J. J; Roof, M. B; McOrist, S. 2004a. Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. American Journal of Veterinary Research, 65, 559-565.
- Kroll, J; Roof, M; Elbers, K; Utley, P. 2004b. Efficacy of a lyophilized avirulent live *Lawsonia intracellularis* vaccine in pigs. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2004, 1, 254.
- Kroll, J; Roof, M; Elbers, K; Utley, P. 2004c. The safety and increased effectiveness of vaccinating pigs with Enterisol® Ileitis in the drinking water. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2004, 1, 272.
- Kroll, J; Roof, M; Elbers, K; Utley, P. 2004d. Maternal immunity associated with *Lawsonia intracellularis* exposure and vaccination. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2004, 1, 255.
- Kroll, J; Roof, M.B, Utley, P.M. 2006. Pre-wean efficacy of an avirulent live *Lawsonia intracellularis* vaccine in pigs 1 day of age. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006, 1, 82.
- Lamm, M.E; Mazaneca, M.B; Nedrud, J.G; Kaetzel, C.S. 1995. New functions for mucosal IgA. Adv Exp Med Biol, 371A: 647-650.
- Lawson, G.H.K; Rowland, A.C; Roberts, L; Fraser, C; McCartney, E. 1979. Proliferative haemorrhagic enteropathy. Research in Veterinary Science, 27, 46-51.
- Lawson, G.H.K; Gebhart, C.J. 2000. Proliferative enteropathy. J Comp Pathol, 122, 77-100
- Lindecrona, R.H; Jensen, T.K; Andersen, P.H; Møller, K. 2002. Application of a 5' Nuclease Assay for Detection of *Lawsonia intracellularis* in Fecal Samples from Pigs. Journal of Clinical Microbiology, 40, 984-987.
- Leblanc, B; Fox, J.G; Le Net, J.L; Masson, M.T; Picard, A. 1993. Hyperplastic gastritis with intraepithelial *Campylobacter*-like organisms in a beagle dog. Veterinary Pathology 30: 391-394.
- Love, R.J; Love, D.N; Edwards, M.J. 1977. Proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. Veterinary Record, 100, 65-68.
- Meyns, T; Timmerman, T; von Freyburg, M; Cluydts, G; Thoonen, H; Maes, D; de Kruif, A. 2004. Safety of Enterisol® Ileitis in pre-breeding gilts in Belgium. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2004, 1, 426.

- McOrist, S; MacIntyre, N; Stokes, C. R; Lawson, G. H. K. 1992. Immunocytological responses in porcine proliferative enteropathies. *Infection and Immunity*, 60, 4184-4191.
- McOrist, S; Muller Wager; A; Kratzer, D; Sjösten, C-G. 2000. Therapeutic efficacy of water-soluble lincomycin-spectinomycin powder against porcine proliferative enteropathy in a European field study. *Veterinary Record*, 146, 61-65.
- McOrist, S; Gebhart, C.J; Boid, R; Barns, S.M. 1995. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 820-825
- McOrist, S; Smits, R. 2006. Field evaluation of the Ileitis vaccine in Australia. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006, 2, 196.
- Nathues, H; Grosse Beilage, E. 2006. Detection of *Lawsonia intracellularis* in pigs vaccinated with Enterisol Ileitis or treated with Tylosin. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006, 1, 84.
- Pelger, G; Kesl, L; Gebhart, C; Armbruster, G. 2004. Enterisol® for ileitis vaccine characterization study. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2004, 1, 407.
- Pusterla, N; Collier, J; Mapes, S.M; Wattanaphasak, S; Gebhart, C. 2009. Effects of administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis* on mares and foals. *Veterinary Record*, 164, 783-785.
- Rowland, A.C; Lawson, G.H.K. 1975. Porcine intestinal adenomatosis: a possible relationship with necrotic enteritis, regional ileitis and proliferative haemorrhagic enteropathy. *Veterinary Record*, 97, 178-180.
- Sanford, S. 2006. Field observations of duration of immunity in Enterisol® Ileitis vaccinated replacement gilts. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006, 2, 195.
- Smith, S.H; McOrist, S. 1997. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Research in Veterinary Science*, 62, 6-10.
- Smith, S.H; McOrist, S; Green, L.E. 1998. Questionnaire survey of proliferative enteropathy on British pig farms. *Veterinary Record*, 142, 690-693.
- Smith, D.G.E; Mitchell, S.C; Nash, T; Rhind, S. 2000. Gamma interferon influences intestinal epithelial hyperplasia caused by *Lawsonia intracellularis* infection in mice. *Infect. Immun.* 68, 6737-6743.
- Smith, D.G.E; Lawson, G.H.K. 2001. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Veterinary Microbiology*, 82, 331-345.
- Stege, H; Jensen, T.K; Møller, K; Bækbo, P; Jorsal, S.E. 2001. Risk factors for intestinal pathogens in Danish finishing herds, *Prev Vet Med*, 50, 153-164.

- Steinheuer, R; Keller, C; Voets, H; Adam, M; Klien, K. 2006. Longitudinal study of Enterisol® Ileitis vaccine efficacy within a German fattening unit. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2, 202.
- Tomanova, K; Literák, I; Klimeš, J; Pavlačík, L; Mrlík, V; Smola, J. 2003. *Lawsonia intracellularis* in wild mammals in the Slovak Carpathians. J Wildlife Dis, 407-411
- Voets, H.C.J.W. 2006. Experiences and recommendations for delivery of Enterisol® Ileitis, an attenuated live culture vaccine, in the drinking water of swine. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006, 2, 204.
- Voets, H.C.J.W; Caspari, K; Eichin, E. 2006. A field efficacy study with Enterisol® Ileitis in Switzerland. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006, 1, 83.
- Ward, G.E; Winkelman, N.L. 1990. Diagnosing, treating, and controlling proliferative enteritis in swine. Vet. Med. 85:3, 312-318
- Winkelman, N.L; Dee, S. 1996. Ileitis: an update. Compendium of Continuing Education of Practicing Veterinarians, 18, 19-25.
- Yamaguchi, T.Y; Takahashi, Y; Miyashita, M; Keller, C; Elbers, K. 2006. A field safety and efficacy trial of Enterisol ileitis vaccine in Japan. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006, 2, 199.