

CLOSTRIDIUM DIFFICILE ASSOCIATED DISEASE IN CZECH PIGLETS PRODUCTION

Masaříková M., Smola J.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Ústav mikrobiologie a imunologie

Úvod

V komplexu infekčních onemocnění prasat mají bezpochyby zásadní význam neonatální enteritidy selat. Stejně jako v jiných zemích s rozvinutým chovem prasat, i v České republice mají tato časná onemocnění velkou důležitost pro ekonomickou rentabilitu reprodukce selat.

U nás stejně jako v dalších evropských zemích přetrvává názor, že hlavními etiologickými agens bakteriálních enteritid sajících selat od 0 do 4 dne věku jsou stále patogenní izoláty *E. coli* a nověji *Clostridium perfringens* typu A.¹ Na rozdíl od publikací popisujících situaci v Evropě, za hlavní etiologické agens neonatálních bakteriálních enteritid v USA je považováno *Clostridium difficile*.² Dopusud bohužel nejsou k dispozici relevantní informace objasňující patogenезi neonatálních enteritid selat ani etiologickou roli jednotlivých enteropatogenů.³ Navíc u některých infekčních agens nebyly jasně stanoveny faktory virulence odpovědné za rozvoj onemocnění.⁴ Například faktory virulence *E. coli*, jsou dobře známy, naproti tomu chybí řada informací potvrzujících etiologickou roli izolátů *C. perfringens* typu A. Tuto situaci lze vysvětlit možným potencováním faktorů virulence více enteropatogenů, eventuálně výskytem nových původců enteritid u novorozených selat.

Takovýmto novým enteropatogenem na evropském kontinentě může být právě *C. difficile*. Ve Spojených státech amerických a v Kanadě je však nejméně u třetiny neonatálních enteritid selat prokázáno více původců enteritid současně, nejčastěji se kromě *C. difficile* jedná o *C. perfringens* typu A a rotaviry.⁵ O výskytu onemocnění vyvolaném *C. difficile* v Evropě bylo referováno pouze roku 1985 ve Švýcarsku⁶ a roku 2003 na Slovensku ovšem v netradičním outdoorovém chovu prasat.⁷

V roce 2005 jsme na našem pracovišti provedli rozsáhlou studii mapující kolonizaci střeva novorozených selat nejvýznamnějšími enteropatogeny. Od té doby jsme se zaměřili na sledování dynamiky neonatálních průjmů včetně enteritid vyvolaných *C. difficile*.

Materiál

Historie a charakteristika farem

Do studie byly zahrnuty dva chovy (A, B) prasat s vysokou úrovní zdravotního stavu. Na obou farmách je aktuální pouze enzootický výskyt infekcí prasnic vyvolaných *Mycoplasma hyopneumoniae*. Farma B je prostá PRRS, zatímco na farmě A je situace dlouhodobě stabilizovaná.

V průběhu září tohoto roku se na porodnách obou farem vyskytla vlna průjmů novorozených selat, jejichž klinický průběh a minimální klinická účinnost na terapeutická opatření se značně lišila od běžných enteritid vyvolávaných kmeny *C. perfringens* typu A. Výskyt enteritid sajících selat vyvolaných enteropatogeny kmeny *E. coli* nebyl na obou farmách zaznamenán již po několik let. Na obou farmách probíhá rutinní vakcinace prasnic proti *E. coli* a *C. perfringens* typu A, na farmě A byla používána autogenní vakcína proti rotavirové infekci.

Farma A. Na farmě A je chováno 670 prasnic v 6 odděleních po 35 zvířatech, s týdenními turnusy porodů. Farma doplňuje prasničky ze stabilního zdroje, kterým je rozmnožovací chov, který neuvádí výskyt nových infekcí. V polovině září byl na této farmě zaznamenán výskyt průjmového onemocnění selat po porodu již ve třetím turnusu prasnic. Morbidita dosahovala až 50 % selat, přičemž mortalita zůstala neovlivněna. První postižené vrhy pocházely od prasniček, které byly nakoupeny v rozmnožovacím chovu, postupně se však onemocnění projevilo i u selat pocházejících od starších prasnic ve stádě. Selata začala projevovat příznaky průjmu od druhého či třetího dne stáří. Přes zachovalou aktivitu sání nepřibývala na váze a průjmovité výkaly vykazovaly vysokou variabilitu barvy i konzistence. Přes průběžná profylaktická opatření v prostředí i preventivní očistu vlastních prasnic před převedením na porodny, dezinfekci struků prasnic před porodem a nasazení antibiotické clony prasnic před porodem, nebylo šíření onemocnění mezi vrhy zastaveno. K antimikrobiální terapii průjmujících selat byl použit amoxicilin potencovaný kyselinou klavulanovou podávaný parenterálně 1 x denně bez zjevného klinického efektu. V některých vrzích, kde selata trpěla úporným vodnatým žlutým či šedozeleným průjmem, byl podán až

pětkrát, než došlo k postupnému zahušťování trusu a vymizení klinických příznaků. Selata, která prodělala infekci, se vracela do optimální kondice až do konce druhého týdne života.

Farma B. Na farmě B je chováno celkem 450 prasnic ve stádě s uzavřeným obratem, které má charakter nukleového chovu. Farma je prostá výskytu PRRS. Stejně jako na farmě A i zde onemocněla selata od druhého dne stáří úpornými průjmy, jejichž klinický průběh byl vážnější, selata výrazně chřadla a snižovala se i aktivita sání. Na rozdíl od farmy A postižení jedinci po překonání infekce váhové úbytky již nevyrovnali, několik týdnů přetrvávala špatná kondice. Barva a konzistence trusu byly rovněž velmi různorodé, často se jednalo o hlenovitý, žlutozelený trus, nicméně nebylo výjimkou zaznamenat jak trus vodnatý, šedozelený, tak žlutý, pastovitý.

Konzistence trusu se postupně během 3 dnů u postižených jedinců zahušťovala, ale bez souvislosti s použitým terapeutickým postupem. K terapii postižených selat byla použita kombinace antibiotik v různých terapeutických protokolech zahrnující amoxicilin i.m., nebo enrofloxacin p.o. či streptonamid.

Metodika

V obou chovech byl od průjmujících selat proveden odběr výkalů na stanovení toxinů *C. difficile* a současně rektální výtěr pro průkaz bakteriálních původců aerobní a anaerobní kultivací. V chovu A byly odebrány vzorky od 19 selat, v chovu B od 14 selat. V chovu A jsme odebrali dále 9 směsných vzorků trusu selat z podlahy kotců stejného vrhu.

Aerobní kultivací byly zjištěny nehemolytické izoláty *E. coli*, molekulárně genetickými a serologickými metodami byla vyloučena jejich patogenita. Záchyt *C. perfringens* proběhl anaerobní kultivací na základě průkazu charakteristické morfologie kolonií s dvojitou zónou hemolýzy po 24-48 hodinové inkubaci (BR 38, Oxoid) na Wilkins-Chalgren agaru (CM 619, Oxoid) s přidavkem 5% ovčí krve při 37 °C. Identifikace byla založena na mikroskopickém průkazu, biochemické aktivitě (negativní katalázová zkouška, pozitivní lecitinázová reakce) a PCR průkazu druhově specifického genu s chromozomální lokalizací (*cpa*). Dále byl sledován výskyt plasmidového genu *cpb2*. Pro přímý průkaz toxinu TcdA ve výkalech byl použit *C. difficile* toxin A test (Oxoid), využívající principu imunanalýzy. Kultivační průkaz *C. difficile* na selektivních půdách, nebyl proveden vzhledem k tomu, že je pro identifikaci virulentních, respektive toxin produkujících kmenů absolutně nedostatečný.

Výsledky

Z rektálních výtěrů 19 průjmujících selat pocházejících z farmy A bylo u 18 kultivačně prokázáno *C. perfringens* typu A s genem *cpb2+* kódujícím tvorbu beta 2 toxinu. Celkem ve 13 případech jsme přímo ve vzorcích výkalů identifikovali přítomnost toxinu TcdA *C. difficile*. Navíc byl v sedmi výkalech zjištěn rotavirus pomocí blocking ELISA testu. Vyšetřením devíti směsných vzorků trusu reprezentujících postižené vrhy jsme v šesti prokázali přítomnost toxinu TcdA *C. difficile*.

U tří selat byl prokázán toxin A *C. difficile* společně s *cpb2* pozitivním *C. perfringens* a rotaviry, devět selat bylo TcdA pozitivní a *C. perfringens cpb2* pozitivní bez průkazu rotavirů. V jednom případě byl jako jediný patogen potvrzen toxinogenní kmen *C. difficile*.

U všech 14 vyšetřených selat s příznaky průjmu pocházejících z 5 vrhů farmy B byl v rektálním výtěru kultivačně potvrzen výskyt *C. perfringens* typu A *cpb2+*, zatímco přítomnost toxinu TcdA *C. difficile* byla zjištěna pouze ve třech vzorcích trusu. To znamená, že jsme u 11 selat prokázali přítomnost pouze *C. perfringens* typu A *cpb2+* a u zbývajících tří selat byl pozitivní průkaz toxinu A *C. difficile* i izolátů *C. perfringens cpb2* pozitivních

Diskuse a závěr

Je možná poněkud překvapivé, že důkazy o hromadném výskytu průjmů selat souvisejících s toxinogenními kmeny *C. difficile* v českých chovech prasat přinášíme právě z chovů s vysokou úrovní zdravotního stavu a intenzivní moderní produkcí selat. V těchto chovech jsme intenzivně sledovali zdravotní stav prasnic a novorozených selat více než dva roky a teprve v září roku 2007 jsme poprvé prokázali přítomnost toxinogenních kmenů *C. difficile*, jako příčiny průjmů. Ke vzplanutí CDAD přitom došlo bez ohledu na odlišný genetický původ prasat. Příčiny náhlého vzniku onemocnění v uvedených chovech jsou nejasné. V nukleovém chovu v Česku, který má zcela uzavřený oběh stáda, je vyloučeno zavlečení toxinogenního kmene zvířetem z jiné farmy, na rozdíl od chovu užitkového, který je pravidelně doplňován prasničkami z rozmnožovacího chovu, který však informace o situaci neposkytuje. V nukleovém chovu by bylo možno vysvětlit vznik CDAD vlivem dlouhodobého používání cefalosporinů u novorozených selat, které může selektovat kmeny *C. difficile* ve střevě selat podobně jako je tomu v USA. Až dosud byl za hlavního původce neonatálních průjmů selat u nás považovány izoláty *Clostridium perfringens* typu A kódované genem *cpb2* pro tvorbu betatoxinu 2. Tento mikroorganismus byl izolován současně z výkalů průjmujících selat obou farem. Domníváme se přesto, že původcem akutního průjmového syndromu byly vysoké hladiny obou toxinů (A a B) *C. difficile*. Vyloučena byla přítomnost dalších původců průjmů selat jako jsou enteropatogenní kmeny *E. coli*, *C. perfringens* typu C a viru transmisivní gastroenteritidy prasat. Pro sledování dalšího vývoje průjmů způsobených toxinogenními kmeny *C. difficile* je zcela nezbytné začlenit do diagnostického systému detekci toxinů ve výkalech průjmujících selat, protože nelze tyto průjmy diferencovat od jiných na základě klinického obrazu. Podle posledních poznatků je rovněž vysoce pravděpodobné, že infekce může probíhat subklinicky, pokud je produkce toxinů v tlustém střevě nižší.⁸ V této době neznáme prevalenci CDAD v České republice, v současnosti můžeme pouze odhadnout, že se onemocnění vyskytuje přibližně až v 10 % chovů. Také v Evropě není prevalence známa vůbec. Příklad zhoršující se situace v amerických chovech ukazuje, jak nesnadné je tlumit CDAD po jejím rozšíření v chovu, vzhledem k nedostupnosti vakcinace.

Literatura

1. Waters M., Savoie A., Garmory H. S., Bueschel D., Popoff M. R., Songer J. G., Titball R. W., McClane B. A., Sarker M. R. Genotyping and Phenotyping of Beta2-Toxigenic *Clostridium perfringens* Fecal Isolates Associated with Gastrointestinal Diseases in Piglets. J Clin Microbiol 2003;8:3584-3591.
2. Songer J.G., Anderson M. A. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. Anaerobe 2006;12: 1-4.

3. Klaasen H. L. B. M., Molkenboer M. J. C. H., Bakker J., Miserez R., Hani H., Frey J., Popoff M. R., van den Bosch J. F. Detection of the b2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. FEMS Immunol Med Microbiol 1999;24:325-332.
4. Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M. R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. Gene 1997;203:56-73.
5. Songer J. G., Jones R., Anderson M. A., Barbara A. J., Post K.W, Trinh H. T. Prevention of porcine *Clostridium difficile*-associated disease by competitive exclusion with nontoxicogenic organisms. Vet Microbiol 2007;124:358–361.
6. Bilkei G., Biro O., Böleskei A., Clavadetscher E., Orban P., Waller C. Practice related management strategies on post-weaning *E. coli* problems in the intensive pig production. Proceedings of the 8th Symposium of International Society for Animal Hygiene. Hung Vet J 1995;10:776–777.
7. Nagy J. and Bilkei G. Neonatal piglet losses associated with *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* infection in a Slovakian outdoor production unit. Vet J 2003;166:98–100.
8. Yaeger M. J., Kinyon J. M., Songer J. G. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. J Vet Diagn Invest 2007;19:52–59.

Studie vznikla v rámci řešení projektu NAZV číslo QF 3218.

Tiráž

Research in Pig Breeding –Výzkum v chovu prasat

Odborný časopis

Vychází dvakrát ročně

místo vydávání : Kostelec nad Orlicí

číslo a den vydání číslo 2 , 31.12. 2007

evidenční číslo periodického tisku přidělené ministerstvem: MK ČR 17776

ISSN 1802-7547

vydavatel: Výzkumný ústav živočišné výroby ,v.v.i.

Přátelství 815

104 00 Praha Uhřetěves

IČ 00027014

adresa redakce: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.

oddělení chovu prasat

Komenského ul. 1239

517 41 Kostelec nad Orlicí

Editor: Ing. Miroslav Rozkot, CSc.

Executive Editor: Ing. Eva Václavková

Editorial Board

Prof. Ing. František Zemánek, CSc.

Prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

Doc. Ing. Josef Čerovský, DrSc.

Ing. Jan Hájek, CSc.