

SIGADE PROLIFERATIIVNE ENTEROPAATIA JA VÕÖRUTUS-JÄRGNE MULTISÜSTEMNE KURNATUSE SÜNDROOM EESTIS

T. Saar¹, T. Järveots¹, R. Lindjärv¹, E. Lepp¹, T. Suuroja¹, D. Põdersoo¹, S. Sütt¹, C. Fossum,² S. Timmusk²

¹ Eesti Maaülikool, ² Rootsi Põllumajandusülikool

ABSTRACT. *Porcine proliferative enteropathies and post-weaning multi-systemic wasting syndrome in Estonia.* The aim of this study was to determine the prevalence of *Lawsonia intracellularis*, porcine circovirus-2 and other intestinal pathogens in Estonian swine farms using PCR, histopathological methods and electronmicroscopical studies. Pathological material was collected from 18 surveyed farms to demonstrate clinical symptoms for porcine proliferative enteropathy (PE) and post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The results indicated that 9 swine farms were infected with *L. intracellularis* and 6 with porcine circovirus-2.

L. intracellularis was found by transmission electronmicroscopic (TEM) investigation of their digestive tracts which caused acute inflammations of jejunum, ileum, cecum and colon. Most of the examined pigs also had a necrosis of mucosa. Intracellular bacteria were found at TEM investigation in the affected epithelium cells of the ileum. It was concluded on the basis of TEM investigation that the intracellular bacteria cause disturbances of normal growth, differentiation and apoptosis of the epithelial cells of ileum.

Keywords: *Lawsonia intracellularis, PRC, Warthin-Starry silver staining, TEM, porcine circovirus-2, porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome.*

Sissejuhatus

Põrsaste võõrutusjärgne kängumine ja suurenenud suremus on tõsiseks probleemiks seakasvatuses kogu maailmas. Sigade proliferaatiivse enteropaatia (SPE) tekitaja *Lawsonia intracellularis* tehti kindlaks 1993. a (Lawson *et al.*, 1993). Seda haigustekitajat on raske isoleerida ja kultiveerida (Guedes *et al.*, 2002). Diagnoosimiseks kasutatakse molekulaarbioloogilisi ja patohistoloogilisi meetodeid ning elektronmikroskoopilisi uurimisi (Jacobson *et al.*, 2003). SPE-d tuntakse ka ileiidina, millesse haigestuvad erinevas vanuses võõrutatud põrsad. Haigus kulgeb ägedalt või krooniliselt, sagedamini esinevat kroonilist kulgu iseloomustab diarröa ning suur kaalu erinevus samas vanuses tervete ja haigete sigade vahel. Enamasti haigestuvad 6–20-nädalased põrsad, neil esineb kasvupeetus, juurdekasvu vähenemine 6–20%, lihakeha tailiha protsendi vähenemine ja kõhulahtisus. Harvemini esineb 4–12-kuustel sigadel äge SPE, mida iseloomustab naha kahvatumine, kõhulahtisus, mustjas või verine roe. Soolkanalis täheldatakse massiliselt verevalumeid, üksikjuhtudel lõpeb haigus äkksurmaga (Lawson *et al.*, 1993).

Nakatamise järel tungib *L. intracellularis* poolduvatesse soolekrüpti epiteelirakkudesse, kus ta liitub rakumembraaniga ja siseneb kiiresti enterotsüüti sisenemisvakuoli kaudu, mis lõhustub 3 tunni jooksul ning bakter saab vabalt membraaniga ümbritsemata raku tsütoplasmas vohada ja paljuneda (McOrist *et al.*, 1996).

Juurdekasvu vähenemine ja söödavääringuse häired kroonilist SPE-d põdevatel sigadel on tingitud soole limaskesta hüperplastilisest proliferatsioonist, mis takistab toitainete imendumist.

SPE-le iseloomulikud patohistoloogilised muutused on soole epiteelirakkude proliferatsioon, paksenenud tühisoole lõpposa ja niudesoole sein.

Sigade võõrutusjärgse multisüsteemse kurnatuse sündroomi (VMKS) tekitaja – sigade tsirkoviirus-2 (PCV-2) – tehti kindlaks 1995. a (Allan, Ellis, 2000; Hassing *et al.*, 2002, 2003). Eristatakse kaht liiki sigade tsirkoviiruse tüvesid: atsütopaatilist PCV-1 ja erinevate sümptomitega seotud patogeenset PCV-2 (Allan *et al.*, 2000). Kliiniliselt iseloomustab haigust põrsaste kiire võõrutusjärgne kängumine, kurnatus, düspnoe, lümfadenopaatia, diarröa, naha kahvatus või ikteerilisus. Et haigust iseloomustavad paljud erinevad tunnused, tuleb diagnoosimisel arvestada ka lahanguleidu ja laboratoorsete uurimiste tulemusi. Patohistoloogiliselt on iseloomulik lümfotsüütide depletsioon ja granulomatoosse põletiku tunnused. Viimased on tihedalt seotud PCV-2 antigeeni rohkusega (Segales *et al.*, 2005).

Karja tasandil võib VMKS esineda sporaadiliselt, üksikutel sigadel mööduvate kliiniliste tunnustega, samas võib viirus põhjustada suurt suremust (kuni 40%) ja pikaajalist laastavat protsessi. Seni pole õnnestunud selgitada haiguse põhjust ja kaasfaktoreid, mis vallandavad VMKS. Retrospektiivsed uurimised näitavad, et sigade tsirkoviirus-2 on tsirkuleerinud karjades aastakümneid (Walker *et al.*, 2000), kuid haigustunnused ilmsesid alles 1995. aastal Kanadas (Harding, Clark, 1997). Mõni aasta hiljem kirjeldati sama sündroomi esimest korda Euroopas (Madec *et al.*, 1999). Põhjamaades diagnoositi VMKS esmalt Taanis 2001. aastal. Haigestumine sageses ja protsess võttis epiidemia mõõtmed 2005. a aprilliks. Edasi levis viirus teistesse Skandinaavia riikidesse.

Võttes arvesse ülaltoodut, st et VMKS on viimastel aastatel levinud ka põhjamaadesse, sealhulgas ka Eestisse, oli käesoleva töö eesmärk teha kindlaks *L. intracellularis*'e, sigade tsirkoviirus-2 ja teiste soole patogeenide esinemine ja nende poolt põhjustatud patomorfoloogilised muutused sigadel Eesti farmides.

Võtmesõnad: *Lawsonia intracellularis*, PCR, Warthin-Starry hõbetamismeetod, TEM, sigade tsirkoviirus-2, sigade võõrutusjärgne multisüsteemne kurnatuse sündroom.

Materjal ja meetodika

Uuringuteks koguti materjali Eestis 18 farmist, kus esinesid proliferaatiivse enteropaatia ja võõrutusjärgse multisüsteemse kurnatuse sündroomi tunnused. Igas farmis korraldati küsitlus loomakasvatuse organiseerimisest, loomade tervislikust seisundist ja raviprotseduuridest.

Põhikarja emiste arv oli erinev (100–9950 emist). Põrsad võõrutati 27.–30. päeval. Farmides rakendati erinevaid biokaitse meetmeid, suurtes farmides "kõik sisse – kõik välja" süsteemi, väikefarmides voolpoegimist.

SPE ja rotaviiruse uurimiseks koguti roojaproove pärasoolest ja säilitati kuni uurimiseni –20 °C juures. Hukkunud loomadelt võeti kaapeid niudesoole epiteelidest.

Kokku uuriti *Lawsonia intracellularis*'ele 1193 proovi. Uuritavast materjalist puhastati DNA (QIAamp® DNA kit, QIAGEN) ja amplifitseeriti PCR-kitiga ADIAVET® LAW, (ADIAGEN – Prantsusmaa).

Rotaviiruse antigeeni määramiseks kasutati lateksaglutinatsiooni kiirtesti ("Omega" – Inglismaa).

Kaheksast farmist, kus esines massiliselt põrsaste võõrutusjärgset kurnatust, uuriti kubeme- ja mesenteriaalseid lümfisõlmi PCV-2-le. Puhastatud DNA-d (DNA Robot Mag kit, QIAGEN) uuriti PCR-ga, milleks kasutati PCV-2 spetsiifilisi praimere, PCR produkt puhastati (QIAEX II) ja sekveneeriti.

Samal ajal uuriti hukkunud põrsaste siseorganeid bakterioloogiliselt nii aeroobses kui ka anaeroobses kultiveerimisrežiimis (Quinn *et al.*, 1994). Kultiveerimiseks kasutati Mac Conkey (Becton Dickinson BBL – USA) ja veriagarit. Viimane valmistati Columbia agari (Becton Dickinson BBL – USA) baasil 10% antikoaguleeritud veise vere lisandusel. Isoleeritud bakterite biokeemiliseks identifitseerimiseks kasutati Crystal süsteemi (Becton Dickinson BBL – USA).

Patohistoloogilise uurimistöö materjalina kasutati 1 kuni 16 nädala vanuseid sigu, kelle soolest ja roojaproovidest määrati PCR-ga *L. intracellularis*. Uurimismaterjal (tühi-, niude-, umb- ja käärsool) fikseeriti 10%-lises neutraalse formaldehüüdi vesilahuses ja Rossmann'i fiksaatoris. Histoloogilised lõigud värviti hematoksüliin-eosiiniga ja Warthin-Starry hõbetamismeetodil. Transmissioon elektronmikroskoopia (TEM) uuringuteks võeti niudesoole limaskesta tükkikesed, mis fikseeriti glutaaraldehüüdi 2,5%-lises lahuses (0,1 M Na kakodülaatpuhveris, pH 7,4). Pärast järelfikseerimist 2%-lises OsO₄ (Agar) vesilahuses dehüdreeriti uuritav materjal etüülalkoholi tõusva kontsentratsiooniga lahustes ja sisestati EPON812 (SERVA). Ultralõigud monteeriti alusvõrkudele ja kontrasteeriti Pb-tsitraadi (Fluka) vesilahuses. TEM uuringud teostati elektronmikroskoobil Philips Tecnai-10.

Tulemused

Virooloogiliseks, bakterioloogiliseks ja molekulaarbioloogiliseks uurimiseks koguti materjal 18 farmist (tabel 1).

Tulemustest selgus, et üheksa farmi oli nakatunud *Lawsonia intracellularis*'ega, kuues farmis diagnoositi PCV-2. Enamikul juhtudest diagnoositi samal ajal enteriiti ja pneumooniat. Kopsupõletiku põhjustajatest esines sagedamini *P. multocida* (neljas farmis) ja *Actinobacillus pleuropneumoniae* (kolmes farmis). Ägeda enteriidi tekitajatest üheksas farmis oli *E. coli*. Kroonilise enteriidi tekitajatest isoleeriti sagedamini *E. coli* ja *Brachyspira hyodysenteriae*.

Uuritavad põrsad jaotati nelja vanusegruppi: 4–8-, 9–12-, 13–16-nädalased ja üle 20 nädala vanused (joonis 1). SPE-d ja *Lawsonia intracellularis*'t diagnoositi pärast võõrutust (23,6%). Tekitaja avastamise protsent kasvas 9–12-nädalastel põrsastel (68,1%), haigestumine hakkas vähenema alates 13. elunädalast (18,8%) ja langes veelgi üle 20-nädalaste loomade seas (12,2%).

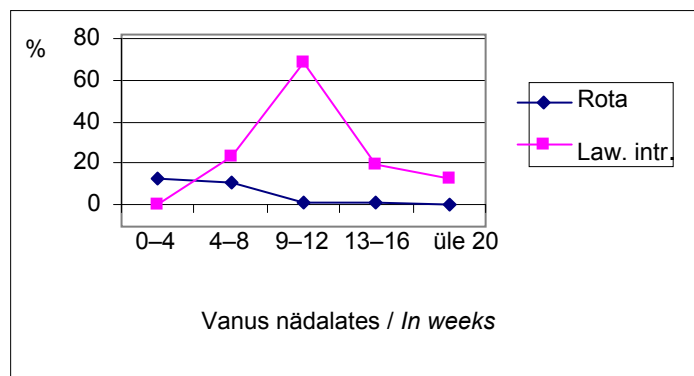
Kõhulahtisust põdevaid põrsaid uuriti ka rotaviiruse antigeeni esinemisele, tulemustest selgus, et sagedamini oli rotaviirus diarröa põhjustajaks kuni kaheksanädalastel põrsastel (12,8%), vanematel põrsastel oli rotaviiruse avastamise protsent madalam: 4–8-nädalastel 10,3% ja 9–12-nädalastel 1,2%.

PCV-2 diagnoositi kuues farmis, kus esines pärast võõrutust põrsaste kurnatus ja kiire kõhnumine. Ühes farmis kasvas võõrutusjärgne suremus 41%-ni.

Lawsonia intracellularis'ega nakatunud sigade protsent oli suurem karjades, kus esines samal ajal PCV-2, *E. coli* ja rotaviiruse segainfektsioon. Erinevaid patogeene diagnoositi sagedamini farmides, kus polnud võimalik rakendada "kõik sisse – kõik välja" süsteemi.

Tabel 1. *Lawsonia intracellularis*'ega ja sigade tsirkoviirus-2-ga nakatunud karjade iseloomustus
Table 1. Characteristics of Estonian swine herds infected with *Lawsonia intracellularis* and porcine circovirus-2

Farm	Võõrutus (päevades) <i>Weaning (days)</i>	Võõrutus-eelne suremus (%) <i>Mortality of sucklings (%)</i>	Võõrutus-järgne suremus (%) <i>Post-weaning mortality (%)</i>	Kõik sisse – kõik välja <i>All in-all out</i>	<i>L. intracellularis</i>	PCV-2	Rotaviirus <i>Rota-virus</i>	Mikrobioloogilise uurimise tulemused <i>Results of microbiological investigations</i>
1.	28–29	7	3	+	–	+	–	<i>E. coli</i>
2.	28–30	16	0,5	–	–	–	–	<i>P. multocida</i>
3.	28	10	15	–	+	+	+	<i>E. coli, P. multocida, Corynebacterium spp</i>
4.	30	1	0,06	–	+	–	–	<i>E. coli, P. multocida</i>
5.	26–30	17	3	+	+	–	+	<i>E. coli</i>
6.	32	8	2	+	+	+	–	–
7.	30	9	6–7	–	+	–	+	<i>Str. agalactiae</i>
8.	28	17	5	–	+	–	–	–
9.	30	10	6	–	–	–	–	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
10.	28	12	14	+	–	+	–	–
11.	–	9,5	7	+	+	–	–	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
12.	27	10	7	+	–	+	–	<i>E. coli</i>
13.	28	9	5	+	–	–	–	–
14.	30	12	27,6	–	+	–	–	<i>E. coli, Brachyspira hyodysenteriae</i>
15.	28–30	10	2	+	–	–	–	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae, P. multocida</i>
16.	30	30	5	–	–	–	+	<i>E. coli,</i>
17.	28	9	8	–	+	–	–	<i>E. coli</i>
18.	30	9	41	+	–	+	–	<i>E. coli</i>



Joonis 1. *Lawsonia intracellularis*'e ja rotaviiruse esinemine sõltuvalt vanusest
Figure 1. Frequency of *Lawsonia intracellularis* and rotavirus detection from pigs according to the age

Sigade soolestiku makroskoopilisel uurimisel täheldati iseloomulikke patoloogilisi muutusi enamasti ainult tühisooles distaalses osas ja niudesooles (lisaks ka umb- ja käärsooles). Ühe- kuni neljanädalastel põrsastel esinesid põletikulised muutused soole limaskestas pindmiselt ja need väljendusid enamasti ägedas katarrhaalses põletikus. Niudesooles ja käärsooles leidis täpjaid verevalumeid ning soolevalendikus verehüübeid, segunenud fibriini ja toidumassidega. Distaalne osa tühisoolest, niudesool, 1/3 proksimaalsest käärsoolest lingust ja umbsoole sein olid paksenenud ja soolevalendik mõõdukalt ahenenud. Tabandunud sooleosa limaskestas esinesid jämenenud risti-, piki- ja põikikurrud (joonis 2a).

4 kuni 16 nädala vanustel kesikutel oli tühisooles distaalne osa ja niudesooles valendik tunduvalt ahenenud sooleseina paksenemise tõttu. Paksenenud seinaga sooleosade avamisel muutunud soolesein sageli rebenes. Selle

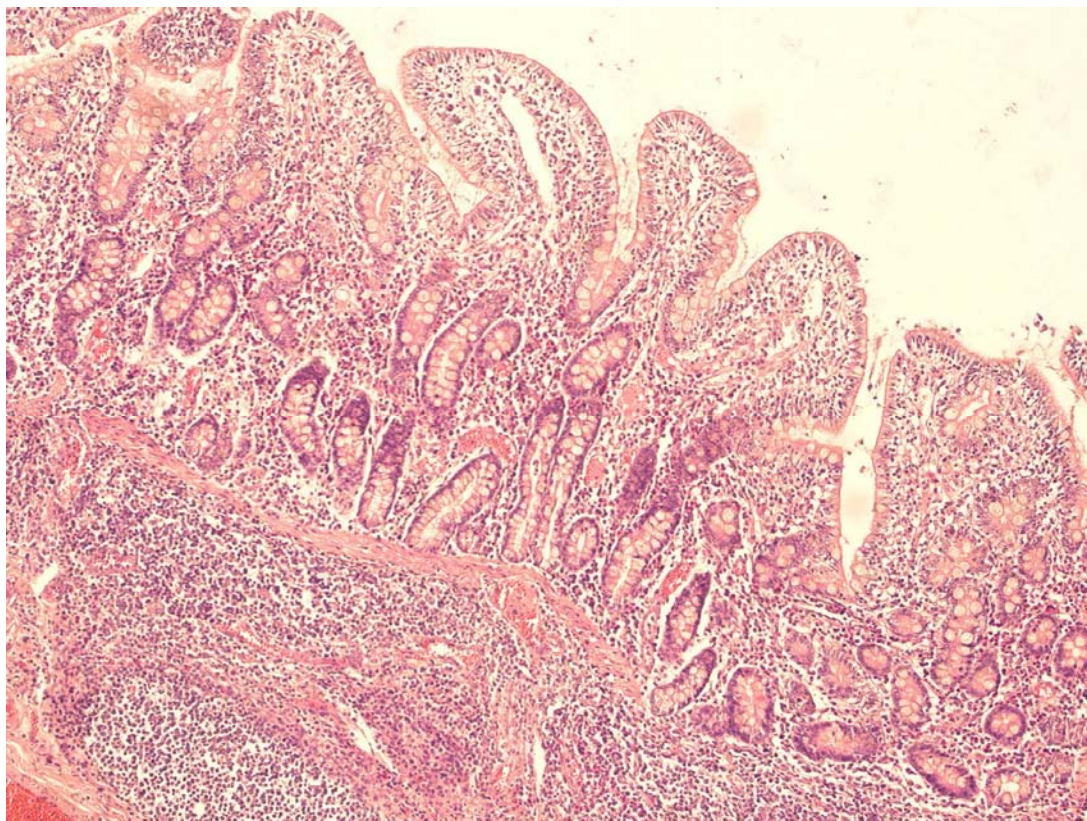
vanusegrupi sigadel täheldati enamikul juhtudel kas krupooset või difteriitset soolepõletikku. Limaskestas esines sageli lõhetaolisi fissuure, harvem jämesoole limaskesta krüptides abstsesse ja haavandite patoloogilise reparatsiooni alusel tekkinud rohkeid granulatsioonikoe vohandeid (pseudopolüüpe).



Joonis 2a. Sea niudesool. Limaskesta paksenemine ja kurrustumine
Figure 2a. Ileum of pig. Thickening and corrugated appearance of the mucosa

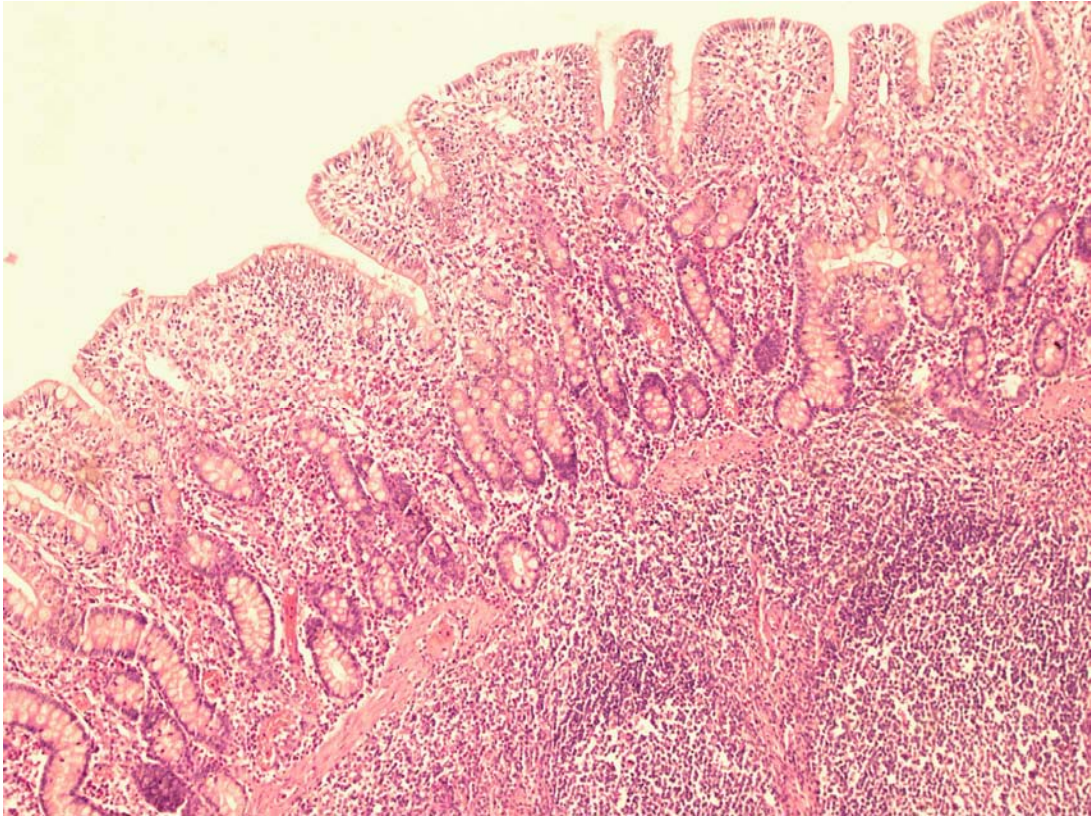
Akuutse tühi-, niude-, umb- ja käärsoole põletiku korral täheldati patohistoloogiliselt vereringehäiretest tingitud hüperemiat, leukodiapedeesi, väikseid verevalumeid ning massilist makrofaagide invasiooni soolekrüptidesse. Kroonilise enteriidi korral oli soolehattude ja soolekrüptide epiteel asendunud proliferatiivsete ebaküpsete epiteelirakkudega, mille tulemusel oli niude- ja tühisoole sein tunduvalt paksenenud. Hattude deformatsioon oli tingitud eelkõige soolenäärmete pikenemisest ja hargnemisest (joonis 2b).

Prooprias esines sageli lümfoidkoe hüperplaasia; kahjustatud krüptides täheldati karikrakkude arvu vähenemist (joonis 2c), limaskestas esines arvukalt eosinofiile, makrofaage ja neutrofiilseid leukotsüüte. Sigade kõikides vanusrühmades ilmnis krüptide pikenemine ja hattude lühenemine. Madalate hattude korral, aga ka hatuvaba (sileda) limaskesta pinnale avanesid krüptid sageli otse (joonis 2d).



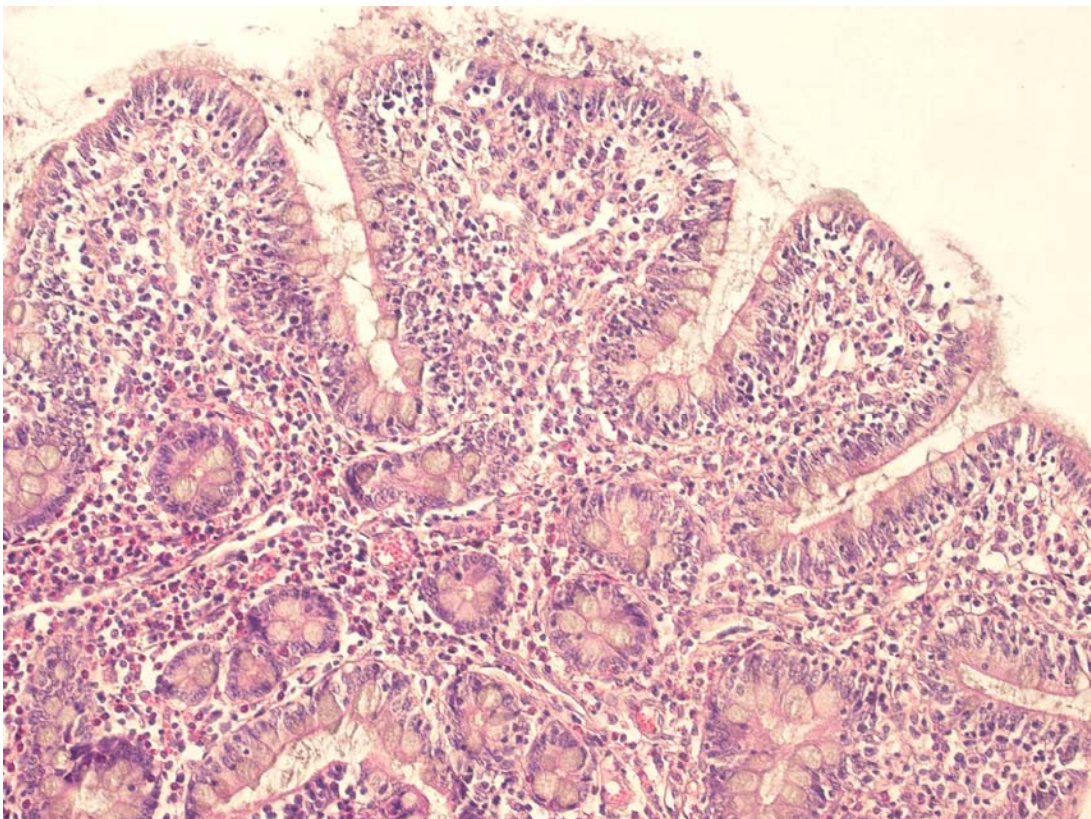
Joonis 2b. Sea niudesool. Soolehattude jämenemine. Lümfofolliikulite hüperplaasia. Hematoksülin ja eosiin. Suurendus 150×

Figure 2b. Ileum of pig. Thickening and deformation of the villus. Hyperplasia of lymphoid follicles. H&E. Magnification 150×



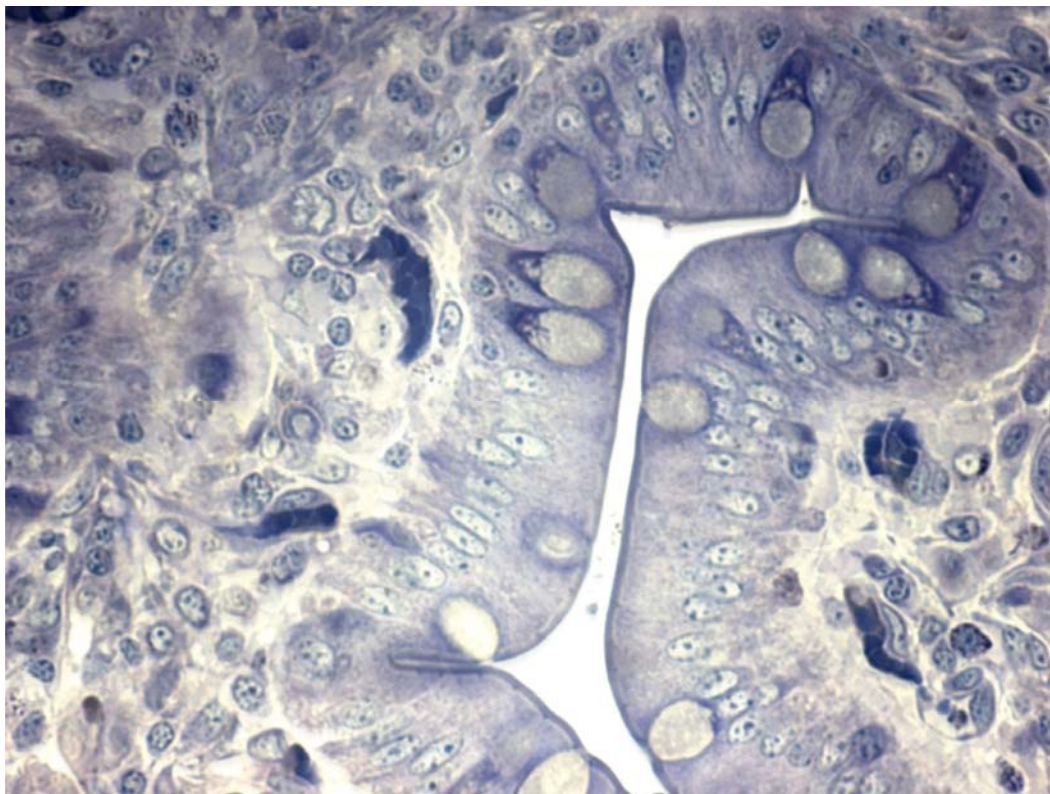
Joonis 2c. Sea niudesool. Hattude deformatsioon, karikrakkude arvu vähenemine, lümfifolliikulite hüperplaasia. Hematoksüliin ja eosiin. Suurendus 150×

Figure 2c. Ileum of pig. Deformation of the villus. Hyperplasia of lymphoid follicles. Lack of goblet cells. H&E. Magnification 150×



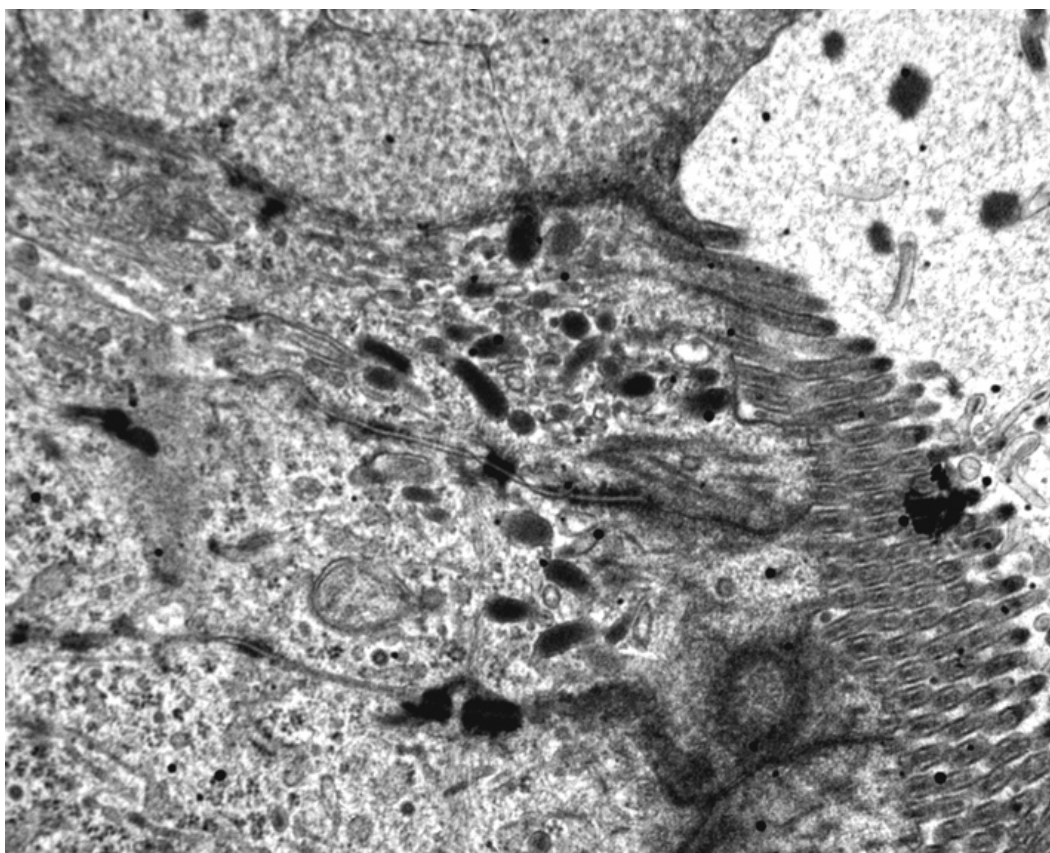
Joonis 2d. Sea niudesool. Limaskestast epiteelirakkude irdumine. Soolehattude jämenemine. Krüpti epiteelirakkude hüperplaasia. Hematoksüliin ja eosiin. Suurendus 200×

Figure 2d. Ileum of pig. Thickening of the villus. Hyperplasia of crypt epithelial cells. H&E. Magnification 150×



Joonis 2e. Sea niudesool. Soole epiteelirakkude osaline degenerereerumine. Poolpaksud lõigud, värvitud toluidiinsinisega. Suurendus 300×

Figure 2e. Ileum of pig. Partial degeneration of crypt epithelial cells. Semithin section. Toluidine blue stain. Magnification 300×



Joonis 2f. Sea niudesool. Umardunud otstega kepisarnased (*Lawsonia intracellularis*) mikroobid näärmeepiteeliraku apikaalses osas. Transmissioon elektronmikroskoopia. Suurendus 17 000×

Figure 2f. Ileum of pig. Curved rod-shaped organisms (*Lawsonia intracellularis*) in the apical cytoplasm of cryptic epithelial cells. Transmission electron microscopy. Magnification 17 000×

Poolpaksude lõikude uurimisel leiti krüptide epiteelirakkudes eelkõige hüperplastilisi muutusi.

Soole epiteelis leiti ka pinnalt kokkutõmbunud (degenereerunud) epiteelirakke (joonis 2e).

TEM-i uuringutel täheldati sageli laienenud soolekrüpte, mis sisaldasid hulgaliselt mitteküpsid epiteelirakke. Sageli puudusid sellistes krüptides ka karikrakud. Osades niudesoole epiteelirakkudes leiti rakusisesid baktereid (joonis 2f).

Väljaarenenud kliiniliste haigustunnustega sigadelt võetud materjalid leiti niudesoole epiteelis rohkesti väikese elektrontihedusega, "pundunud", epiteelipinnast välja ulatuvaid, aga ka kitsaid, kokkusurutud degenereerunud rakuorganoididega rakke. Rohkesti esines apoptootilisi kehakesi nii epiteelirakkude vahel kui ka makrofaagides. Epiteelirakud moodustasid sageli mitmesuguse kujuga soolevalendikku väljakummuvaid väikese elektrontihedusega (heledaid) protrusioone. Viimaste pinnal puudusid enamasti mikrohatud ja nad sisaldasid rakusisesid baktereid, mis paiknesid näärmeepiteeliraku apikaalses osas. Osal sellistest tabandunud rakkudest olid tuumad, mitokondrid, endoplasmaatilise retiikulumi membraanid ja Golgi kompleksid normaalse ultrastruktuuriga, teistel seevastu aga degenereerunud.

Arutelu

Käesolev töö selgitas välja põrsaste võõrutusjärgset kurnatust põhjustavate patogeenide esinemist ja iseloomu Eesti seafarmides.

Sigade proliferatiivset enteropaatiat esineb paljudes riikides endeemiselt (Chiriboga *et al.*, 1999; Pearce, 1999; Lawson, Gebhart, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Stege *et al.*, 2001; Suh *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Jacobson *et al.*, 2003; Plawinska *et al.*, 2004).

Tüüpilistel juhtudel esineb SPE krooniliselt või subkliiniliselt. Raskemat kroonilist kulgu iseloomustab lisaks kõhulahtisusele ka märkimisväärselt suur hulk kängunud põrsaid (McOrist *et al.*, 1995).

Farmides, kus esines põrsaste kurnatust, seedetrakti ja hingamiseldite kahjustusi, isoleeriti erinevaid patogeene. Võõrutatud põrsastel põhjustasid kõhulahtisust *E. coli*, *L. intracellularis* ja rotaviirus, hingamiselditest isoleeriti samal ajal *P. multocida* ja *Actinobacillus pleuropneumoniae*. SPE esineb Eesti farmides segainfektsioonina.

Võrreldes põrsaste haigestumise vanust rotaviirusnakkusesse ja SPE-sse, selgus, et rotaviiruse antigeeni avastati sagedamini esimesel elukuul, alates teisest elukuust hakkas rotaviiruse osa kahanema ja diagnoositi esimesi *L. intracellularis* juhtumeid. Martella jt (2001) uuringutest ilmnes, et rotaviirusnakkus esineb peamiselt imikpõrsastel ja põhjustab 5–8% põrsaste hukkumise.

Lawsoni ja Gebharti (2000) ning Suh ja Songi (2005) uurimistulemustest selgus, et *L. intracellularis* esineb multiinfektsioonina koos teiste seedetrakti patogeenidega, sagedamad neist on *Brachyspira hyodysenteriae* ja *Salmonella spp.*

Kuues farmis esines võõrutusjärgne multisüsteemne kurnatuse sündroom, mis koos teiste haigustekitajatega põhjustas põrsaste massilist haigestumist ja suurt suremust. Sigade tsirkoviirus-2 hakkas Euroopas ulatuslikumalt levima alates 1999. a (Hassing *et al.*, 2002, 2003; Kennedy *et al.*, 1998; Labarque *et al.*, 2000; Segales *et al.*, 2005). Võõrutusjärgset kurnatust põhjustavad viirused on Eestis isoleeritud alates 2006. a. VMKS esineb iseseisva haigusena harva, sageli lisanduvad kaasinfektsioonid. J. Ellise ja kaasautorite (2000, 2004) uurimistulemustest selgus, et sigade tsirkoviirusega samal ajal on diagnoositud sigade parvoviirust, sigade arteriviirust, *Mycoplasma hyopneumoniae*'d ja teisi sigade respiratoorhaiguste kompleksi patogeene. Meie uurimistulemustest selgus, et koos PCV-2-ga diagnoositi hingamisteede patogeenidest *P. multocida* ja *Actinobacillus pleuropneumoniae* ning sooletrakti patogeenidest *E. coli* ja *L. intracellularis*.

L. intracellularis'e põhjustatud soole proliferatiivne põletik iseloomustub oma lokaliseerimise ja morfoloogilise leiuga. Eriomane põletik esineb enamasti tühisooles lõpposas ja niudesooles, kuid põletikulised muutused võivad esineda peale tühi- ja niudesoole ka umb- ja käärsooles. Sarnaseid patomorfoloogilisi muutusi kirjeldatakse paljudes teadustöös (Joens *et al.*, 1997; MacIntyre *et al.*, 2003; Gebhart *et al.*, 1993; Lawson *et al.*, 1993; McOrist *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 2006). Jenseni jt (2006) tööst järeldub aga, et *L. intracellularis* lokaliseerub peamiselt käärsooles, põhjustades seal proliferatiivseid muutusi. Lawsoni jt (1993), McOristi jt (1995) ja Gebharti (1993) andmetel lokaliseerub *L. intracellularis* eelistatult tühisooles lõpposa ja niudesoole soolekrüptide kahjustatud enterotsüütides. Et mittevalminud enterotsüütidel mikrohatud puuduvad kas osaliselt või täielikult, võib järeldada, et *L. intracellularis* lokaliseerub just nende sooleosade enterotsüütides. TEM-i uuringute põhjal võib järeldada, et rakusisesed bakterid põhjustavad tabandunud niudesoole epiteelirakkude normaalse kasvu ja diferentseerumise häireid ning apoptoosi.

Võttes arvesse meie poolt saadud tulemusi, on tõenäoline, et sigade niudesoole epiteelirakkude kahjustumine *L. intracellularis*'e poolt on seotud tabandunud kudede hüperplastilise proliferatsiooniga. Ka McOristi jt (1995) uurimised näitasid, et bakterite puudumine sooleepiteeli vigastuskolletes on seotud soole epiteelirakkudes toimivate normaalsete apoptootiliste protsesside jätkumise ja limaskestast apoptoosijärgse normaalse struktuuri taastumisega.

Kokkuvõte

Põrsaste võõrutusjärgset kurnatust, juurdekasvu pidurdumist ja suurenenud suremust põhjustavad mitmesugused faktorid. Käesoleva uurimisega selgitati bakteriaal- ja viirusnakkuste osa selles protsessis.

Uuriti 18 farmi, millest üheksas esines sigade proliferatiivne enteropaatia ja kuues sigade tsirkoviirus-2 nakkus (PVC-2), kahel juhul esinesid *Lawsonia intracellularis* ja PCV-2 ühel ajal. Sigade proliferatiivse enteropaatia tekitaja (*Lawsonia intracellularis*) avastati sagedamini 9–12-nädalastel kõhulahtisust põdevatel põrsastel (68,1%). Lisaks isoleeriti enteriidi tekitajatest *E. coli* ja *Brachyspira hyodysenteriae* ja hingamiseldidest *P. multocida* ja *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Eestis on diagnoositud sigade tsirkoviiruse-2 nakkus alates 2006. aasta detsembrist kuues farmis, kus esines põrsaste võõrutusjärgset kurnatust, kängumist ja suremuse tõusu.

L. intracellularis'e esinemisel sigade seedetraktis leiti SPE-le iseloomulikke makroskoopilisi muutusi. Tabandunud tühisooles lõpposa, niudesooles, enamasti ka 1/3 proksimaalsest koolonist ja umbsooles sein olid tunduvalt paksenenud ja soolevalendik märgatavalt ahenenud. Sigade patohistoloogilistel ja transmissioon elektronmikroskoopilistel uuringutel leiti rakusiseseid baktereid ja *L. intracellularis*, mis tekitasid nii ägedat tühi- ja niude-, aga ka umb- ja käärsoole põletikku. TEM-i uuringute põhjal järeldati, et rakusisesed bakterid põhjustavad tabandunud niudesooles epiteelirakkude normaalse kasvu ja diferentseerumise häireid ning apoptoosi.

Uurimistööd toetasid Põllumajandusministeeriumi projekt "Sigade enteropaatiate diferentsiaaldiagnostika, tõrje ja profülaktika" ja Eesti Teadusfond grant 5747 ja Euroopa Liidu projektid (FOOD-CT-2004-513928), PCVD STREP-PCVD 513928 ja NMSSAC-PCVD 51843 ja EL kuues raamprogramm: PRIORITY SSP/5.4.6 Control of Porcine Circovirus Diseases (PCVDs): Towards Improved Food Quality and Safety; SSA (specific support action).

Kirjandus

- Allan, G. M., Ellis J. A. 2000. Porcine circoviruses: a review. – Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 12, p. 3–14.
- Allan, G. M., McNeilly, E., Kennedy, S., Meehan, B., Moffett, D., Malone, F., Ellis, J., Krakowka, S. 2000. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. – Veterinary Record, 146, p. 711–712.
- Chiriboga, A. E., Guirraes, W. V., Vanetti, M. C., Araujo, E. F. 1999. Detection of *Lawsonia intracellularis* in feces of swine from the main producing in Brazil. – Can. J. Microbiol., 45, p. 230–234.
- Ellis, J. A., Bratanich, A., Clark, E. G., Allan, G., Meehan, B., Haines, D. M., Harding, J., West, K. H., Krakowka, S., Konoby, C., Hassard, L., Martin, K., McNeilly, F. 2000. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. – Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 12, p. 21–27.
- Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan, G. M. 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. – Veterinary Microbiology, 98, p. 159–163.
- Gebhart, C. J., Barns, S. M., McOrist, S., Lin, G. F., Lawson, G. H. 1993. Ileal symbiont intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. – Int. J. Syst. Bacteriol., 43(3), p. 533–538.
- Guedes, R. M. C., Gebhart, C. J., Winkelman, N. L., Mackie-Nuss, R. A., Marsteller, T. A., Deen, J. 2002. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. – Can. J. Vet. Res., 66, p. 99–107.
- Harding, C. J., Clark, E. G. 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). – J. Swine health Prod., 5, p. 20–203.
- Hassing, A. G., Botner, A., Ladekjaer-Mikkelsen, A. S., Baekbo, P., Jorsal, S. E., Bille-Hansen, V. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome in Denmark. – Proceeding of the 17th International Pig Veterinary Society, p. 173.
- Hassing, A. G., Botner, A., Ladekjaer-Mikkelsen, A. S., Kristensen, C. S., Jorsal, S. E., Bille-Hansen, V., Baekbo, P. 2003. Characterisation of the first cases of PMWS in Denmark. – Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. PRRS, PMWS, Swine Influenza, Rome, p. 211–212.
- Jacobson, M., Englund, S., Ballagi-Pordány, A. 2003. The use of a mimic to detect polymerase chain reaction-inhibitory factors in feces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*. – Journal Vet. Diagn. Invest., 15, p. 268–273.
- Jensen, T. K., Christensen, B. B., Boye, M. 2006. *Lawsonia intracellularis* infection in the large intestines of pigs. – APMIS, 114(4), p. 255–264.
- Joens, L. A., Nibbelink, S., Glock, R. D. 1997. Induction of gross and microscopic lesions of porcine proliferative enteritis by *Lawsonia intracellularis*. – Am. J. Vet. Res., 58(10), p. 1125–1131.

- Kennedy, S., Allan, G., McNeilly, F., Adair, B. M., Hughes, A., Spillane, P. 1998. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. – *Veterinary Record*, 142 (18), p. 495–496.
- Labarque, G. G., Nauwynck, H. J., Mesu, A. P., Pensaert, M. B. 2000. Seroprevalence of porcine circovirus types 1 and 2 in the Belgian pig population. – *Veterinary Quarterly*, 22 (4), p. 234–236.
- Lawson, G. H. K., Gebhart, C. J. 2000. Proliferative enteropathy. – *Journal of Comparative Pathology*, 122, p. 77–100.
- Lawson, G. H., McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R. A. 1993. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. – *J. Clin. Microbiol.*, 31(5), p. 1136–1142.
- Madec, F., Humbert, F., Salvat, G., Maris, P. 1999. Measurement of the Residual Contamination of Post-Weaning Facilities for Pigs and Related Risk Factors. – *J. of Veterinary Medicine Series B*, 46, p. 37–45.
- Martella, V., Pratelli, A., Greco, G., Tempesta, M., Ferrari, M., Losio, M. N., Buonavoglia, C. 2001. Genomic Characterization of Porcine Rotaviruses in Italy. – *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(1), p. 129–132.
- MacIntyre, N., Smith, D. G., Shaw, D. J., Thomson, J. R., Rhind, S. M. 2003. Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. – *Vet. Pathol.*, 40(4), p. 421–432.
- 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. – *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45(4), p. 820–825.
- McOrist, S., Roberts, L., Jasin, S., Rowland, A. C., Lawson, G. H. K. 1996. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: Possible pathogenetic mechanisms. – *J. Comp. Pathol.*, 115, p. 35–45.
- Moreno, A. M., Baccaro M. R., Coutinho, L. L. 2002. *Lawsonia intracellularis* detection in swine feces from important producing regions in Brazil. – *Arq. Inst. Biol., San Paulo*, 69(3), p. 5–8.
- Pearce, G. P. 1999. Epidemiology of enteric disease in grower-finisher pigs: a postal survey of pig producers in England. – *Veterinary Record*, 144, p. 338–342.
- Plawinska, J., Klimczak Z., Jakubowski, T., Klawe, W., Binek, M. 2004. Nested PCR and IFAT in the diagnosis of porcine proliferative enteritis. – *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 48, p. 247–250.
- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. K., Carter, G. R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, 648 pp.
- Segales, J., Allan, G. M., Domingo, M. 2005. Porcine circovirus disease. – *Animal Health Res. Rev.*, 6, p. 119–142.
- Stege, H., Jensen, T. K., Møller, K., Bækbo, P., Jorsal, S. E. 2001. Risk factors for intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. – *Preventive Veterinary Medicine*, 50, p. 153–164.
- Suh, D-K., Lym, S-K., Bae, Y-C., Lee, K-W., Choi, W-P., Song, J-C. 2000. Detection of *Lawsonia intracellularis* in diagnostic specimens by one-step PCR. – *J. Veterinary Science*, 1(1), p. 33–37.
- Suh, D. K., Song J. C. 2005. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* in swine herds. – *J. Vet. Sci.*, 6 (4), p. 289–293.
- Zhang, P., Gebhart, C. J., Burden, D., Duhamel, G. E. 2000. Improved diagnosis of porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* using polymerase chain reaction – enzyme-linked – oligosorbent assay (PCR-ELOSA). – *Molecular and Cellular Probes*, 14, p. 101–108.
- Yeh, J. Y., Kim, T. J., Park, S. Y., Song, C. S., Yoon, Y. D., Kim, S. K., Lee, J. B., Choi, I. S. 2006. Isolation of *Lawsonia intracellularis* in Korea and reproduction of proliferative enteropathy in pigs and hamsters. – *J. Vet. Med. Sci.*, 68(5), p. 499–501.
- Walker, I. W., Konoby, C. A., Jewhurst, V. A., McNair, I., McNeilly, F., Meehan, B. M., Cottrell, T. S., Ellis, J. A., Allan, G. M. 2000. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. – *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12, p. 400–405.

Porcine proliferative enteropathies and post-weaning multi-systemic wasting syndrome in Estonia

T. Saar, T. Järveots, R. Lindjärv, E. Lepp, T. Suuroja, D. Põdersoo, S. Sütt, C. Fossum, S. Timmusk

Summary

Porcine post-weaning wasting, weight loss and increased mortality are caused by different factors, mainly by bacterial and viral agents. The aim of this study was to determine the prevalence of *Lawsonia intracellularis*, porcine circovirus-2 and other intestinal pathogens in Estonian swine farms using PCR, histopathological methods and electronmicroscopical studies.

Pathological material was collected from 18 surveyed farms to demonstrate clinical symptoms for porcine proliferative enteropathy (PE) and post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).

The results indicated that 9 swine farms were infected with *L. intracellularis* and 6 with porcine circovirus-2.

In Estonia, porcine circovirus-2 was not associated with clinical disease until recently, December 2006, when the virus was isolated from PMWS pigs. The clinical symptoms of PCVD in Estonian cases were comparatively severe and the mortality (including runts) was 11–50%.

In most cases enteritis and pneumonia were diagnosed simultaneously with PE and PMWS. *E. coli* was isolated in the cases of the acute and subacute enteritis. The main agents of the pneumonia were *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

The pigs under examination were divided into four groups according to their ages: 4–8, 9–12, 13–16 weeks and over 20 weeks old. The beginning of PE infection was found in 4–8 weeks old group (23.6%). The prevalence of the infected pigs was relatively higher in the 9–12 weeks old group (68.1%). The number of diseased pigs decreased after 13 weeks.

In pathoanatomic studies of the alimentary tract of the swine, characteristic macroscopic changes to PE were found which were mainly localised in the rear part of jejunum and in the ileum. The affected mucosa is thrown into deep folds, longitudinal and transverse. Pigs of 4 to 16 weeks old had the most complicated festering changes in the canal of the gut. The distal part of the jejunum, ileum and the upper third of proximal colon and cecum wall had thickened visibly and the gut lumen had narrowed. Hyperplasia of lymphoid derma and, in many cases, croupous or diphtheritic inflammations were found.

L. intracellularis was found with 57 young pigs at the histopathological investigation of their digestive tracts which caused acute inflammations of jejunum, ileum, cecum and colon.

Mainly severe necrosis and granulomatous inflammation and often focal areas of hemorrhage in the lamina propria of the affected intestinal mucosa were histopathological findings. The affected crypts were often located over aggregated lymphoid nodules. Goblet cells were absent from these crypts which were surrounded by large numbers of eosinophils, neutrophils and macrophages in adjacent lamina propria. However, there was often continued proliferation of immature epithelial cells which resulted in marked elongation, enlargement and branching of crypts.

L. intracellularis was found by transmission electronmicroscopic (TEM) investigation of their digestive tracts which caused acute inflammations of jejunum, ileum, cecum and colon. Most of the examined pigs also had a necrosis of mucosa. Intracellular bacteria were found at TEM investigation in the affected epithelium cells of the ileum. It was concluded on the basis of TEM investigation that the intracellular bacteria cause disturbances of normal growth, differentiation and apoptosis of the epithelial cells of ileum.