

Test of antibacterial feed additives in a *Brachyspira hyodysenteriae* infection model

Adorján András^{1*}
Rafai Pál¹
Papp Zoltán¹
Brydl Endre¹
Jakab László¹
Kovács Péter¹
Jurkovich Viktor¹
Makrai László²
Balka Gyula³
Kovács Melinda⁴
Bata Árpád⁵
Könyves László¹

A. Adorján^{1*}
P. Rafai¹
Z. Papp¹
E. Brydl¹
L. Jakab¹
P. Kovács¹
V. Jurkovich¹
L. Makrai²
Gy. Balka³
M. Kovács⁴
Á. Bata⁵
L. Könyves¹

1. SZIE ÁOTK Állathigiéniai, Állomány-egészségtani és Állatorvosi Etológiai Tanszék H-1078 Budapest, István u. 2.

* e-mail: adorjan.andras@aoatk.szie.hu

2. SZIE ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

3. SZIE ÁOTK Patológiai Tanszék

4. Kaposvári Egyetem Agrár- és Környezettudományi Kar Élettani és Állathigiéniai Tanszék

5. Dr. Bata Biotechnológiai Kutató-Fejlesztő Zrt.

Antibakteriális hatású kísérleti takarmányadalékok hatékonyságának vizsgálata *Brachyspira hyodysenteriae*-vel fertőzött malacokban

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők egy modellkísérletben arra kerestek választ, hogy a sertésdizentéria (SD) klinikai megjelenése megakadályozható-e, ill. a tünetek enyhíthetők-e az erre a célra fejlesztett, két, nem antibiotikus hatású, kísérleti készítmény valamelyikével. Két csoport (Dys-1 és Trial-D1) takarmányához a fejlesztés alatt álló két készítmény egyikét, valamint 2 mg/kg koncentrációban T-2 toxint keverték a harmadik (T-2) csoporthoz hasonlóan. Majd a kísérleti etetés 19. és 20. napján a sertéseket sertésdizentériában elhullott sertések vastagbélkaparékából frissen készített szuszpenzióval fertőzték az előző három és a negyedik (Kontroll) csoportot. Utóbbiak T-2 toxin és adalékmentes takarmányt fogyasztottak. A hasmenések súlyosságát 5 pontos (0–4) skálán értékelték és Fischer-féle egzakt próbával igazolták, hogy a hasmenések pontszámának gyakoriságát az alkalmazott kezelések módosították. A kísérlet alatt a Dys-1 csoport átlagos testtömege és testtömeg-gyarapodása nagyobb volt, mint a kontroll és a többi csoporté. A kísérlet alapján a Dys-1 készítmény további fejlesztése és félüzemi kísérletekben való kipróbálása indokolt. A fertőzési modell kisebb változtatásokkal alkalmas az SD tanulmányozására.

SUMMARY

Two, non-antibiotic feed additives (Dys-1 and Trial-D1) developed for prevention and alleviation of clinical symptoms of swine dysentery (SD) were studied in an infection model. The feed of two groups (Dys-1, Trial-D1) contained one of the additives and similarly to the third group (T-2) T-2 toxin (2 mg/kg) as well. After 19 days of intake all of the four groups ('Control' group too which did not consume T-2 toxin and any additives) were inoculated with fresh colon scraping of SD affected pigs via gastric tube. Form, appearance and consistency of faeces following the infection was qualified by a 5-grade (0–4) scoring system. Fisher exact probe demonstrated that frequency of diarrhoea scores depended on treatments. Average live weight and daily weight gain of Dys-1 pigs were found superior to that of the others. Gross pathological lesions of SD were found exclusively in pigs that showed the clinical signs of the disease at the time of exsanguination. Data of the present experiment justifies further improvement of Dys-1 and semi-field trials with the upgraded additive. The infection model, with minor alterations, seems suitable for further studies with SD.

SERTÉS

Arra kerestük a választ, hogy a sertésdizentéria (SD) klinikai megjelenése megakadályozható-e, ill. a tünetek enyhíthetők-e az erre a célra fejlesztett, két (ideiglenesen Dys-1, ill. Trial-D1 fantázianevű), nem antibiotikus hatású kísérleti készítmény valamelyikével. Vizsgálataink másik célja az volt, hogy a két takarmányadalék hatékonyságát kipróbáljuk az általunk kidolgozott fertőzési modell segítségével.

Két, nem antibiotikus hatású kísérleti készítményt vizsgáltak

A *B. hyodysenteriae* leggyakrabban fertőzött sertések egészséges társaik közé kerülésével terjed

A kórokozó szintenyészetével csak nehezen váltható ki a betegség

A *B. hyodysenteriae* oki szerepének tanulmányozására végzett modellkísérletekben gyakran alkalmaztak a sertés ellenálló képességét gyengítő tényezőket

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A sertésdizentéria a növendéksertések világszerte előforduló, súlyos, akár 30%-os elhullással is járó betegsége (22). A betegségben kialakuló hasmenés súlyossága az enyhe, nyálkás formától a véresig változhat. Amíg a jogszabályok az antibiotikumok megelőző céllal való etetését megengedték, a klinikai tünetek gyakran a kezelés beszüntetését követően jelentkeztek. A kórokozó leggyakrabban a szubklinikailag fertőzött sertések egészséges társaik közé kerülésével terjed (4). A *Brachyspira hyodysenteriae* (*B. hyodysenteriae*) sertésbélárban való hosszú túlélési ideje, továbbá a kutyákban, rágcsálókban, rovarokban való előfordulása miatt a biológiai biztonsági előírások megtartása is fontos szerepet játszik a megelőzésben (1, 2, 3, 4, 5, 8, 14, 15, 23, 30).

A betegséget először WHITING és mtsai (34) írták le 1921-ben, ám a *B. hyodysenteriae* oki szerepét csak 1971-ben sikerült bizonyítani, egy a *B. hyodysenteriae*-ből készített levestenyészettel végzett fertőzéssel (11, 31). Ezt követően sokan próbálkoztak a betegség kísérleti előidézésével, többnyire sikertelenül. Így pl. hasonló fertőzési modellben gnotobionta sertéseket nem sikerült megbetegíteni (17). Nem járt sikerrel a kísérleti fertőzés akkor sem, ha az inoculum *Brachyspirák* mellett a normál bélflóra egyes összetevőit (*E. coli*, *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp.) is tartalmazta (19). Viszont ha a levestenyészethez sertésdizentériában beteg sertések vastagbélkaparékát adták, a sertések nagy arányban mutatták a dizentéria tüneteit (18, 21).

A vastagbélkaparékkal végzett sikeres fertőzések szinergizmusra utalnak a *B. hyodysenteriae* valamint a *Bacteroides* spp., *Escherichia coli*, *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Listeria* spp., ill. *Vibrio coli* törzsek között (11, 12, 18, 19, 33). Ehhez a felismeréshez járul hozzá az a tapasztalat, hogy a *B. hyodysenteriae* jelen lehet a sertésekben anélkül, hogy a betegség klinikai tünetekben megnyilvánulna (10, 20).

Az említettek magyarázzák a ma már általánosan elfogadott nézetet, miszerint a sertésdizentéria olyan összetett okú betegség, amelynek klinikai megjelenéséhez a védelmi rendszerek kudarcára és/vagy a fertőzéses terhelés szokásos mértéket meghaladó szintjére van szükség. Nem meglepő ezért, hogy a *B. hyodysenteriae* oki szerepének tanulmányozására alkalmazott modellkísérletekben gyakran alkalmaztak a sertés nem specifikus ellenálló képességét gyengítő tényezőket (pl. szteroidokat, koplaltatást, a gyomor savas kémhatásának semlegesítését, a takarmány összetételének módosítását stb.) (13, 29), ill. különböző fertőzési módokat próbáltak ki (pl. különböző baktériumfajok keverékből előállított inoculumokat, levestenyészetek és vastagbélnyálkahártya-kaparékok változatait stb.). A vonatkozó vizsgálatok változó eredménnyel jártak, és sajnálatosan még ma sem rendelkezünk egy minden tekintetben megbízható és reprodukálható kísérleti modellel. Vizsgálataink egyik célja ezért egy újabb modell kidolgozása és gyakorlati kipróbálása volt.

Az antibiotikumok hozamfokozóként és megelőzőként való alkalmazásának 2006. január 1-jén bevezetett tilalmát követően a sertésdizentéria növekvő mértékben jelenhet meg a fertőzött állományokban (7, 9), ezért a védekezés új, alternatív lehetőségei egyre nagyobb hangsúlyt kapnak. A telepi tartási/

takarmányozási/gondozási körülmények szükségszerű optimalizálása mellett a jelenlegi kutató-fejlesztő munka hatékonyabb vakcinák, vakcinázási eljárások, ill. antibiotikum-pótló pre- és probiotikumok kifejlesztésére irányul. Vizsgálataink másik célja ezért az volt, hogy a KMR_12-1-2012-0020 kutatási program keretében kifejlesztett két (ideiglenesen Dys-1, ill. Trial-D1 fantázianevű) takarmányadalék hatékonyságát kipróbáljuk az általunk kidolgozott fertőzési modell segítségével.

SAJÁT VIZSGÁLATOK

A KÍSÉRLETI MODELL

A fertőző anyag (*inoculum*). A szakirodalomban fellelhető adatok szerint egyaránt van példa a fertőzött állományokból izolált, majd anaerob körülmények között elszaporított *B. hyodysenteriae* levestenyézzel történő fertőzésre (31), törzsgyűjteményből származó ismert törzsek felhasználásával készített fertőző anyag alkalmazására (13) és az SD heveny klinikai tüneteit mutató sertés vastagbelének nyálkahártya-kaparékából frissen készített inoculum beadására (21). A fertőzést az inoculum minőségétől és a kísérlet céljától függően egyszer vagy többször alkalmazhatják *per os* takarmányhoz vagy ivóvízhez keverve (31), gyomorszondán (16) vagy vakbélkanulón át (13).

A fertőző anyagot SD tüneteit mutató, leölt állat vastagbél-tartalmából és a nyálkahártya-kaparékából készítették

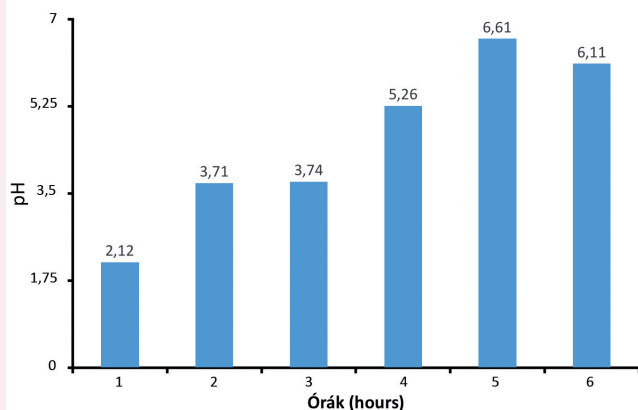
Saját kísérletünkben az inoculumot frissen készítettük egy, az SD heveny tüneteit (véres, nyálkás hasmenést) mutató sertés vastagbelének nyálkahártya-kaparékából. A beteg sertés elvéreztetését követően eltávolítottuk a vastagbelet, amelyet 4 °C-ra hűtve laboratóriumba szállítottunk. A kórbonctani elváltozást (duzzadt, bővérű nyálkahártyát, felületes, diffúz, korpaszerű elhalást) mutató szakaszok kivágását követően, az elváltozott részben található teljes bél-tartalmat és a lekapart nyálkahártyát PBS-oldatban szuszpendáltuk, majd 0,5 mm porúsátmérőjű szűrőn leszűrtük.

Az egyenletesen szuszpendált inoculum 5 µl-ét fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgálva látóterenként 5–25 *Brachyspira*-alakot találtunk. Az inoculumból és a fertőzésre használt sertés vastagbél-nyálkahártyájából baktériumizolálást is végeztünk. A fajszintű azonosításhoz az izolátumból QIAamp DNA Mini Kit, (Qiagen Inc.) használatával DNS-t vontunk ki, majd univerzális, a 16S rRNS génen tapadó primereket használva (2, 28) annak egy szakaszát amplifikáltuk és szekvenáltattuk. A szekvenanciaadatokat a génbank adatbázisával összevetve az izolátum *B. hyodysenteriae*-nek bizonyult.

A védekező rendszer gyengítése. A korábban alkalmazott fertőzési modell kísérletekben a sertés védekezőképességét többnyire kortikoszteroidok (pl. dexame-tazon) alkalmazásával gyengítették, a fertőzés megakadályozását biztosító első védelmet, a gyomor savas pH-ját pedig savköttőkkel növelték, a fertőzés mege-redeése szempontjából többnyire eredménytelenül.

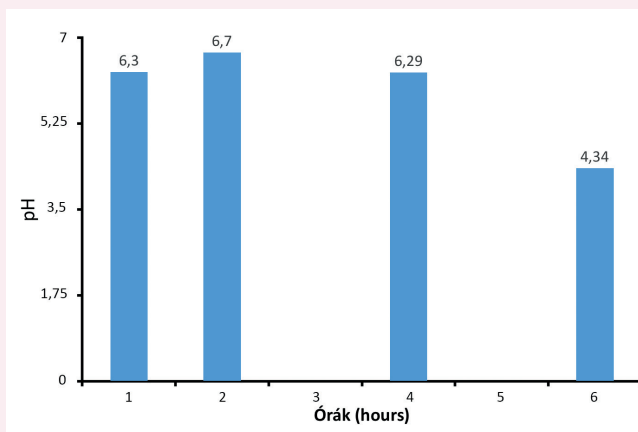
A gyomor pH-jának emelésére protonpumpagátlót alkalmaztak

Saját kísérletünkben a gyomor-pH emelésére protonpumpagátlót használtunk. Ezek a többnyire benzimidazol-vegyületek jelentősen és hosszabb időre csökkentik a gyomor-nyálkahártya fedősejtjeinek sósavtermelését. Miután sertésen történő alkalmazásukról a szakirodalomban nem találtunk adatokat, egy előkísérletben tájékozódó vizsgálatot végeztünk. Egy 25 kg testtömegű sertésnek 3 ml infúziós oldatban feloldott 40 mgesomeprazol (Nexium, gyártó: AstraZeneca) adtunk mélyen im. Az injekció beadása előtt, majd ezt követően fél, egy, két, három, négy, ill. 5 óra múlva, enyhe bódításban (0,2 mg/ttkg azaperon, Stresnil inj. A.U.V.), nyelőcsőszondával gyomortartalom-mintát vettünk, amelynek pH-ját Radelkis No. 7024 típusú pH-mérővel meghatároztuk (1. ábra). Egy következő kísérletben a tájékozódó kísérletet ivóvíz biztosítása mellett 18 órás koplaltatást követően megismételtük. A 2. ábra azt mutatja be, hogy az ad libitum vízfogyasztás mellett alkalmazott éheztetés a gyomortartalom pH-értékét majdnem semleges



1. ÁBRA. Gyomor pH-értékének alakulása a protonpumpa-gátló beadását követően (Nexium, 40 mg/sertés im.)

FIGURE 1. Gastric pH following the im. administration of a proton pump inhibitor (Nexium, 40 mg/pig im.)



2. ÁBRA. Az éheztetés 18. órájában alkalmazott proton-pumpagátló hatása a gyomornedv pH-jára

FIGURE 2. Effect of a proton pump inhibitor on the pH of gastric juice administered after 18 hrs of fasting

kémhatásra növelte, amelyet a protonpumpa-gátló már alig növelt. Erre alapozva döntöttünk úgy, hogy a kísérleti fertőzést és a protonpumpa-gátló beadását megelőzően a sertéseket koplaltatjuk.

Az a megfigyelés, hogy az SD gyakran jelentkezett olyan állományokban, amelyekben T-2 toxinnal szennyezett takarmányt etettek (néhai VÁNYI ANDRÁS személyes közlése), valamint saját kísérleti eredményeink (25, 26, 32) arra készítettek, hogy fertőzési modellünkben a sertések immunműködését T-2 toxin alkalmazásával károsítsuk. A T-2 toxint a Kaposvári Egyetem Agrár- és Környezettudományi Kar Élettani és Állathigiéniai Tanszékének Mikotoxin Laboratóriumában termelték az *F. sporotrichoides* NRRL 3299 törzs szilárd táptalajon történő elszaporításával.

Az általunk alkalmazott fertőzési modellkísérlet főbb jellemzői összefoglalva a következők voltak: beteg sertés vastagbélnyálkahártya-kaparakából készített friss szűrlet inoculumként való használata, a nem specifikus védelem koplaltatással és protonpumpa-gátlóval, valamint az immunrendszer T-2 toxinnal történő gyengítése.

Kísérleti takarmányadalékok

Trial-D1: szürkészöld színű, enyhén higroszkópos, por-szerű anyag, páravédő csomagolásban. Javasolt adag: 10 kg/tonna takarmány. Dys-1: kellemes gyógynövényillatú, ugyancsak szürkészöld színű, homokszerű anyag, amelynek javasolt adagja: 1 kg/tonna takarmány.

A készítmények pontos összetételéről a gyártó nem közölt bővebb adatokat, annak jelenleg még nem publikus volta miatt.

Kísérleti állatok; elhelyezés és takarmányozás

A kísérlethez 24 magyar nagyfehér × dán lapály F1, 28 napos korban választott, ártány malacot használtunk, amelyek átlagos tömege a kísérlet kezdetén $14,6 \pm 2,2$ kg volt.

A süldőket négy, egyenként 6 egyedből álló csoportra osztottuk. Az egyes csoportokat (T-2 – I; Dys-1 – II; Trial-D1 – III; Kontroll – IV) külön-külön, klimatizált kamrákban felállított utónevelő battériákba helyeztük (csoportonként 2 battéria, 3–3 malaccal; $< 0,5$ m²/süldő alapterület), és optimális mikroklima és gondozási körülmények között neveltük a kísérlet végéig.

Bár számos példa van arra, hogy a takarmány összetétele is befolyásolja a *B. hyodysenteriae*-vel történő kísérletes fertőzés eredményét, a jelen kísérletben átlagos összetételű növedéksertés-tápot használtunk, és nem kíséreltük meg a fertőzés eredményességét befolyásolni pl. a takarmány keményítő-, szója- (6) vagy szeléntartalmának (24) változtatásával. Ennek megfelelően a vizsgálat idején antibiotikumot nem tartalmazó startertápot ettünk (gyártó: Vitafort ZRt; nyersfehérje: 18,11%; DE sertés min.: 13,8 MJ/kg; ME sertés min.: 13,38 MJ/kg; nyersrost: 3,9%; nyerszsír: 2,9%; nyershamu: 4,6%; lizin: 1,21%; kalcium: 0,72% és foszfor: 0,56%).

A kísérlet elrendezése

A kísérlet 8 hétig tartott, amely 9 nap megfigyelési, 19 nap bevezető és 4 hét kísérleti szakaszra tagolódott. A megfigyelési szakaszt követően a Dys-1 és

Trial-D1 csoport fokozatos átmenettel a kísérlet lezárásáig olyan takarmányt kapott, amely a csoport nevével azonos takarmánykiegészítőt tartalmazott a javasolt koncentrációban. Az említett csoportok és a T-2 csoport takarmánya a bevezető szakasz 19 napja alatt, valamint a kísérleti szakasz első hetében (a 7. napig) összesen tehát 26 napon át kg-onként 2 mg T-2 toxint is tartalmazott. A kontrollcsoport takarmánya kiegészítőket és (kimutatható mennyiségben) mikotoxinokat nem tartalmazott.

Kísérleti fertőzés

A növendéksertéseket a kísérleti tápok etetésének 19. és 20. napján fertőztük a frissen készített szűrlettel. A kísérleti fertőzés első napján 7 órás koplaltatást követően a kontrollcsoport egyedei kivételével a malacokat protonpumpagátlóval kezeltük a korábban ismertetett módon. További 3–5 órás koplaltatás után nyugtató beadása mellett (azaperon 0,2 mg/ttkg Stresnil inj. A.U.V.) (27) nyelőcsőszondán át gyomortartalom-mintát vettünk, amelynek pH-ját meghatároztuk, majd a frissen készített inoculum 140 ml-ét a süldők gyomrába juttattuk. Az első fertőzést követő 20–24. órában, további koplaltatás mellett a malacokat enyhe bódításban ismételten fertőztük, ezúttal a szűrlet 200 ml-es adagjával. A kontrollcsoport egyedeit nem koplaltattuk és protonpumpagátló kezelésben sem részesítettük.

Klinikai megfigyelések

A sertések testtömegét heti rendszerességgel, egyedi mérlegeléssel nyomon követtük. Naponta feljegyeztük a kiosztott takarmány mennyiségét, valamint a heti mérlegelések alkalmával az etetőben maradt takarmánymennyiséget is. Ezekből az adatokból számítottuk ki a csoportok testtömeg-gyarapodását, átlagtömegét és a csoportok fajlagos takarmányfelhasználását.

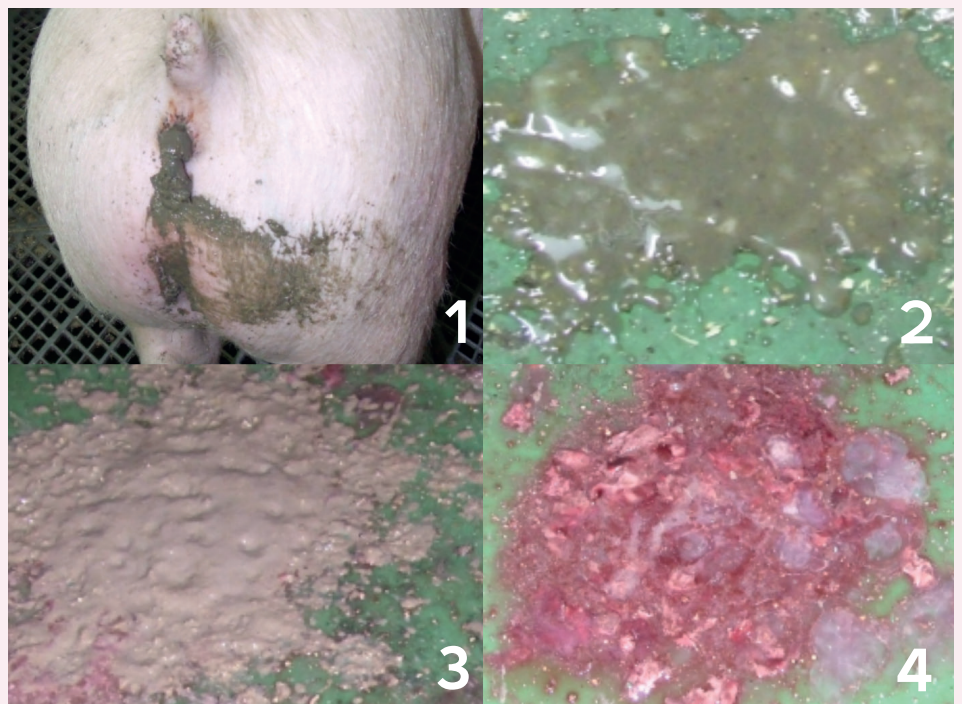
A sertéscsoportokat beszállítástól a kísérleti fertőzésig naponta legalább egy alkalommal, a kísérleti fertőzést követően pedig naponta két alkalommal, alkalomként 15–20 percig megfigyeltük a reggeli és esti takarmánykiosztást köve-

A malacokat 7 órás koplaltatást, majd a protonpumpagátló beadását követő további 3–5 óra koplaltatást követően fertőzték

Mérték, ill. kiszámolták a testtömeg-gyarapodást, a csoportok átlagtömegét és a fajlagos takarmányfelhasználást

3. ÁBRA. Hasmenések pontszámai képekben 1-től 4-ig

FIGURE 3. Scores of diarrhoea from 1 to 4



Megfigyelték az állatok
klinikai tüneteit és
pontozták az ürített
bél­sár állagát

A fertőzést követő
28. napon leölt állatokat
felboncolták, a vastag-
belekből kórszöveti
vizsgálatot végeztek

tően. A kísérleti periódusban végzett megfigyelések elsődleges célja a kondíció és az étvágy nyomon követése mellett a hasmenés első jelentkezésének, tartamának, valamint az ürített bélsár minőségének meghatározása volt. A bélsár minősítéséhez egy nullától négy pontig terjedő pontozásos rendszert alkalmaztunk, amelyben a 0 pont a normális, jól formált, fajra jellemző bélsarat jelentette, a számok pedig emelkedő sorrendben jellemezték a vastagbél gyulladássalos folyamatainak súlyosságát (1 = lágy, nedves cement konzisztenciájú bélsár; 2 = híg, folyékony bélsár; 3 = nyálka- és/vagy fibrin tartalmú hasmenés; 4 = véres hasmenés (3. ábra). A könnyebb értékelhetőség érdekében az 1-es és 2-es, valamint a 3-as és 4-es kategóriákat összevontuk. Ennek megfelelően O, A (enyhe hasmenés = 1 + 2 kategória), és B (súlyos hasmenés = 3 + 4 kategória) kategóriákat hoztunk létre.

A kísérlet lezárása

A kísérleti fertőzést követő 28. napon a hatályos állatvédelmi rendeletnek megfelelően kiirtott sertéseket a szakma szabályai szerint boncoltuk, majd a vastagbél különböző szakaszaiból mintát vettünk kórszöveti vizsgálatra. A mintákat szobahőmérsékleten, 24 órán át, 8%-os pufferolt (PBS, pH 7,0) formaldehidoldatban konzerváltuk, majd paraffinba ágyasztuk. Az így elkészített blokkokból 3–4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket hematoxilinnel és eozinnal, ill. Warthin–Starry-módszerrel festettünk meg.

A szövettani metszetekben tapasztalt gyulladássalos elváltozások súlyosságát 0–4 értékű skálán pontoztuk. Ebben a pontozásos rendszerben nulla ponttal jelöltük az intakt, gyulladássalos elváltozást nem mutató szövetrészleteket. 1–4 ponttal értékeltük azokat a mintákat, amelyek sorrendben a gyulladás enyhe (1), enyhe-mérsékelt (2), közepesen súlyos (3), ill. súlyos (4) jeleit mutatták.

A kísérleti adatok statisztikai feldolgozása

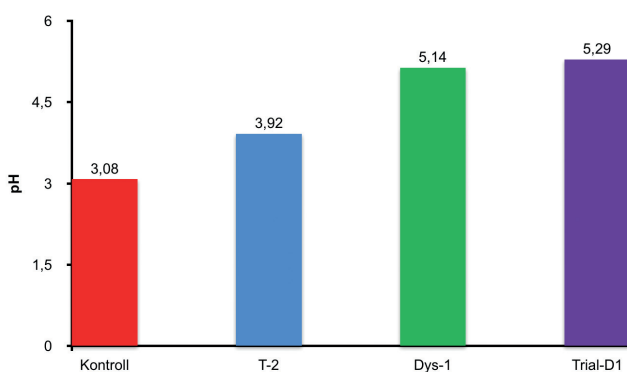
Az adatok statisztikai értékelése során a hasmenéses tünetek függetlenség vizsgálatára Fisher-féle egzakt próbát használtunk az R statisztikai program (R Core Team) segítségével.

EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK MEGVITÁTÁSA

A gyomortartalom pH-értékeinek meghatározása a korábban leírtak szerint történt. A 4. ábra az első fertőzést megelőzően vett gyomortartalom pH-értékeit mutatja

be. Az értékek a protonpumpagátló alkalmazásának hatékonyságát bizonyítják. A T-2 kontrollcsoport viszonylag savasabb pH-értékét a gyomortartalomban az okozhatta, hogy a csoport kísérleti fertőzése időben a többi három csoportét követte, így az utolsóként fertőzött malacokban a protonpumpagátló hatása már lecsengőben lehetett.

A kísérleti fertőzés az összes sertést megbetegítette, ami a fertőzési modell eredményességét bizonyítja. Más összevethető kísérletekben a fertőzés eredményessége igen változó volt (13). Egy kontrollsüldő a hasmenéses tünetek jelentkezését követő hetedik napon (a kísérleti szakasz kilencedik napján) elhullott. A kórbonctani vizsgálat során a vastagbelet érintő, diffúzan jelentkező korpaszerű elhalásos jellegű elváltozás volt látható, benne híg, vörhenyes tartalommal. Az elhullott, ill. leölt sertések vastagbeléből gyűjtött kórbonctani mintákból a kórokozó (*B. hyodysenteriae*) szelektív táptalajon visszaizolálásra került.



4. ÁBRA. A gyomortartalom pH-értéke

FIGURE 4. pH of gastric juice

1. TÁBLÁZAT. Hasmenés megjelenése, tartama és a bélsárpontok összesített adata

TABLE 1. First appearance and duration of diarrhoea and accumulated faeces scores

Csoportok (1)	Súlyos hasmenés első megjelenése (nap) (2)	Hasmenéses napok (A+B) száma (3)	Súlyos hasmenés (B) tartama (nap) (4)	Bélsár pontok összege (5)
Kontroll	8,3 ± 6,1	16,4 ± 4,6	9,0 ± 7,1	198
T-2	5,8 ± 2,2	18,3 ± 9,7	6,8 ± 6,2	167
Dys-1	6,3 ± 4,3	17,5 ± 9,4	8,3 ± 7,0	193
Trial-D1	5,3 ± 4,0	17,7 ± 6,3	9,2 ± 7,1	194

1: groups; 2: first appearance of heavy diarrhoea; 3: accumulated days of diarrhoeic days; 4: duration of heavy diarrhoea, days; 5: accumulated faecal scores

2. TÁBLÁZAT. A csoportokon belüli súlyos hasmenés (B) gyakoriságának összehasonlítása az enyhe hasmenések (A) gyakoriságával Fisher-féle egzakt próbával

TABLE 2. Comparison of frequency of heavy scouring (B) with that of the mild (A) diarrhoea by the Fischer exact probe

Csoportok	OR	p-érték
T-2 és Kontroll	2,75	0,0041*
Dys-1 és Kontroll	1,32	0,42
Trial-D1 és Kontroll	1,49	0,25

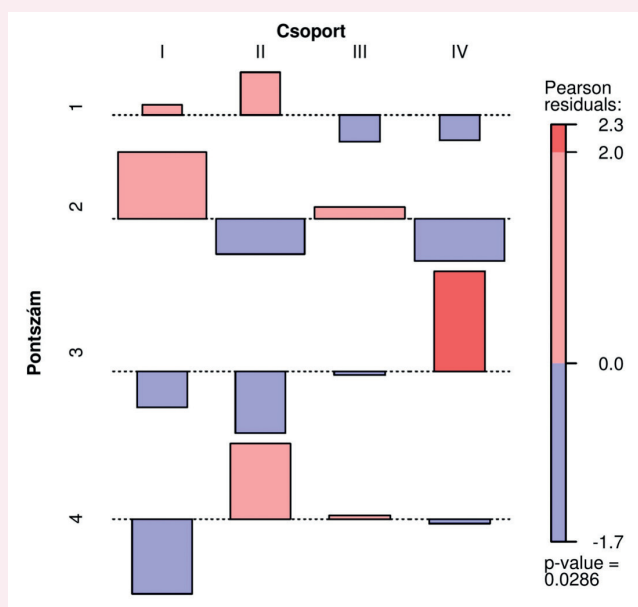
(OR: esélyhányados; P: 95%-os konfidencia; *: szignifikáns)

(OR: odd ratio; p: at 95% confidence; *: significant)

5. ÁBRA. A hasmenés súlyossági kategóriák előfordulási gyakoriságának összefüggése az egyes csoportok kezelésével

I – T-2; II – Dys1; III – Trial D1; IV – Kontroll

FIGURE 5. Connection between incident rates of severity of diarrhoea with treatment of the groups



A súlyos hasmenés (B) megjelenésének első napját, a hasmenés tartamát és az egyes csoportok összesített bélsárpontját az 1. táblázat mutatja be.

A négy csoport és az azokban előforduló tünetek gyakorisága közötti összefüggést a Fisher-féle egzakt próbával ellenőriztük (2. táblázat). A Fisher-féle egzakt próba a kontrollcsoportban lévő súlyos hasmenés (B kategória) előfordulásának nagyobb valószínűségét igazolta, amely összehasonlítás a T-2 csoport esetében szignifikánsnak bizonyult ($p = 0,004$). A vonatkozó asszociációs ábra (5. ábra) a megfigyelt és várható gyakoriságok eltérését a Pearson-reziduumok alapján mutatja be.

A sertéscsoportok átlagos testtömegét és annak napi gyarapodását a 3. táblázat foglalja össze. Látható, hogy a kísérleti fertőzést megelőzően mért tömeg (alapérték) a sertések korának megfelelően alakult, és egymástól szignifikánsan nem

3. TÁBLÁZAT. A csoportok átlagos testtömege és testtömeg-gyarapodása a kísérlet során**TABLE 3.** Average live weight and daily weight gain of the groups

Csoportok (1)	Betelepítéskor (2)	Fertőzés időpontjában (4)		Kísérlet befejezésekor (6)	
	Átlagos testtömeg (kg) (3)	Átlagos testtömeg (kg) (3)	Napi átlagos testtömeg-gyarapodás (kg/sertés) (5)	Átlagos testtömeg (kg) (3)	Napi átlagos testtömeg-gyarapodás (kg/sertés) (5)
Kontroll	14,67 ± 1,37	34,30 ± 2,35	0,70 ± 0,05	37,70 ± 10,18	0,12 ± 0,59
T-2	14,58 ± 2,20	35,22 ± 4,05	0,74 ± 0,12	36,50 ± 13,41	0,04 ± 0,40
Dys-1	14,58 ± 1,91	33,72 ± 5,64	0,68 ± 0,17	45,33 ± 13,65	0,40 ± 0,34
Trial-D1	14,33 ± 2,16	33,22 ± 5,72	0,67 ± 0,20	38,75 ± 12,79	0,19 ± 0,45

1 – groups; 2 – at start of the experiment; 3 – average weight, kg; 4 – at the time of experimental infection; 5 – average daily weight gain, kg; 6 – the end of the experiment

A Dys-1 csoport a fertőzés ellenére is képes volt testtömeg-gyarapodásra, de ez nem volt statisztikailag szignifikáns

különbözött. A kísérleti fertőzés eredményeként a csoportok tömeggyarapodása megtorpant, sőt a kísérlet egyes szakaszaiban testtömegveszteség is előfordult. Ez alól kivétel a Dys-1 csoport, amely a fertőzés ellenére is képes volt gyarapodásra. Az elvégzett statisztikai számítások nem tudták bizonyítani a Dys-1 takarmányadalék fölényét a többi kezeléssel szemben. A tendenciájában ($p = 0,12$) kedvező eredmény azonban biztató, és remény van arra, hogy egy nagyobb létszámmal megismételt modellkísérletben vagy egy jól megtervezett félüzemi kísérletben a jelenlegi eredmény statisztikai számításokkal is megerősíthető lesz. A másik takarmányadalékot (Trial-D1) fogyasztó kísérleti csoport adatai lényegében a kontrollcsoport adataihoz hasonlóan alakultak, bizonyítván, hogy a készítmény (figyelembe véve a kísérlet egyéb adatait is) jelenlegi összetételében nem alkalmas az SD klinikai tüneteinek mérséklésére és a fertőzött sertések termelési mutatóinak javítására.

A kontrollcsoport testtömeg-gyarapodási adatai számos más szakirodalmi adattal egybehangzóan ismételtelen bizonyították, hogy az időben, hatékony gyógyszerrel nem kezelt SD igen jelentősen ronthatja a sertések termelési mutatóit. A T-2 csoport átlagos napi takarmányfogyasztása a kísérleti periódus 1., 2. és 3. hetében 22, 47, ill. 32%-kal kisebb volt a kontrollcsoporténál, és a két csoport takarmányfogyasztása csak az utolsó héten vált hasonlóvá. A takarmányfogyasztási adatok különbségében bizonyára szerepe volt annak, hogy a T-2 kontrollcsoport a kísérleti periódus első hetében még T-2 toxinnal szennyezett takarmányt fogyasztott, azaz a hatásában (takarmányadalékkal) nem kompenzált T-2 toxin jelentősen súlyosbította a kísérleti fertőzés takarmányfogyasztásra gyakorolt negatív hatását.

A vastagbél részletes kórbonctani vizsgálata során nyilvánvalóvá vált, hogy csak azok a sertések mutattak kóros elváltozásokat a vastagbélben, amelyek a leölés pillanatában még mutatták az SD klinikai tüneteit (6. ábra A). Ezek bakteriológiai, kórbonctani és kórszövettani vizsgálatának eredményeit a 4. táblázat foglalja össze. A leölés során még klinikailag beteg sertések kórszövettani metszeteiben nagy számban *Brachyspira*-szerű alakokat lehetett felfedezni (6. ábra B). A kísérlet végén leölt összes sertés kórszövettani vizsgálatának átlagolt eredményeit az 5. táblázat mutatja be. Az eredmények szerint a Dys-1 csoportban a sertésdizentéria okozta elhalás mértéke jóval elmaradt a többi csoportban tapasztaltakétól, annak ellenére, hogy a *Brachyspira*-alakok száma nem tért el jelentősen a többi csoporttól.

A leölés során még klinikailag beteg sertések kórszövettani metszeteiben nagy számban *Brachyspira*-szerű alakokat lehetett felfedezni

4. TÁBLÁZAT. A kísérlet lezárásakor a dizentéria klinikai tüneteit mutató sertések bakteriológiai, kórbonctani és kórszövet-tani vizsgálatának eredményei

TABLE 4. Bacteriological, pathological and patho-histological data of pigs that showed the clinical signs of dysentery at conclusion of the experiment

Csoport/azonosító szám (1)	Párhuzamos tenyészetek (2)			Kórbonctani lelet (3)	Kórszövet-tani lelet (4)			
	1	2	3		gyulladás (11)	elhalás (12)	<i>B. coli</i> (13)	<i>Brachyspira</i> -szerű alak (14)
T-2 csoport/2. sertés	+/-	-	-	nincs jellegzetes kórbonctani elváltozás (5)	2	0	1	0
T-2 csoport/6. sertés	+++	++	+	helyenként kipirult, ödémás nyálkahártya (6)	1	1	1	3
Dys-1 csoport/2. sertés	+++	++	++	idült, multifokális, fibrines-elhalásos gyulladás (7)	2	1	0	3
Dys-1 csoport/6. sertés	+++	++	+/-	nincs jellegzetes kórbonctani elváltozás (5)	3	0	0	1
Trial-D1 csoport/2. sertés	+++	+++	+++	közepes-súlyos idült, multifokális, fibrines-elhalásos gyulladás (8)	4	2	4	2
Trial-D1 csoport/3. sertés	+/-	+/-	-	nincs jellegzetes kórbonctani elváltozás (5)	3	2	4	3
Kontrollcsoport/3. sertés	++	++	-	helyenként multifokális, fibrines-elhalásos gyulladás (9)	2	1	3	4
Kontrollcsoport/6. sertés	+++	+++	+++	súlyos, idült, hashártyagyulladás, súlyos, idült diffúz, fibrines-elhalásos gyulladás (10)	3	4	2	3

1 – Group/identity number of pig; 2 – Parallel cultures; 3 – Gross pathological signs; 4 – Histopathology; 5 – no characteristic pathological sign; 6 – flushed, oedematous mucosa; 7 – chronic, multifocal, fibrinous layers; 8 – medium-heavy, chronic, multifocal, fibrinous-necrotic layers; 9 – scattered multifocal fibrinous-necrotic layers; 10 – heavy, chronic peritonitis, heavy, chronic, diffuse fibrinous-necrotic colitis; 11 – inflammation; 12 – necrosis; 13 – *Balantidium coli*; 14 – *Brachyspira*-like structure
-: no *Brachyspira* colony; +/-: few, suspicious/queer colony; +: B. colony in small number; ++: medium number of B. colony; +++: B. colonies in high number

5. TÁBLÁZAT. Kórszövet-tani vizsgálatok

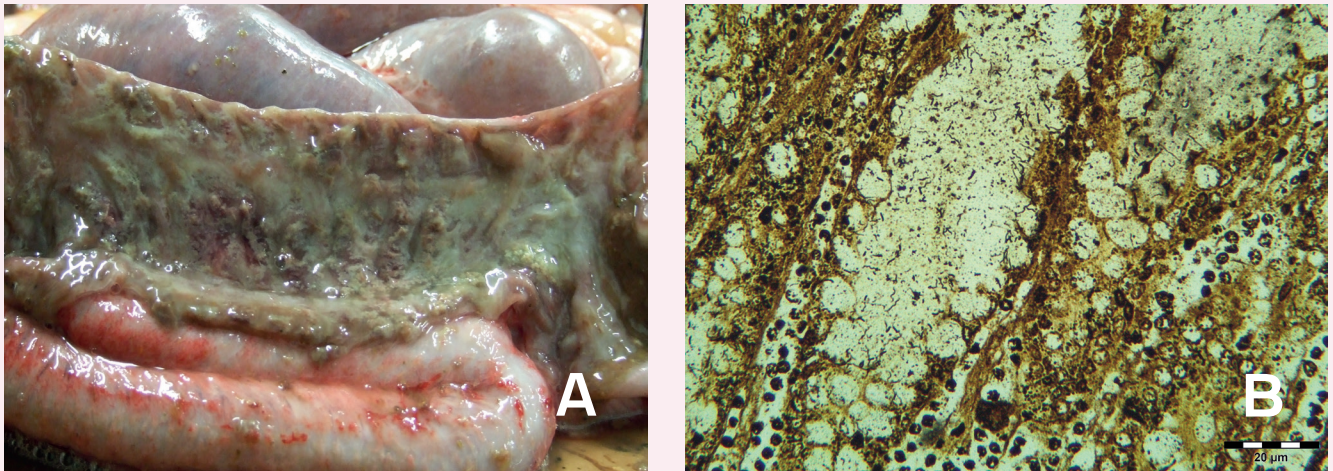
TABLE 5. Histopathological examination

1 – groups; 2 – histopathology; 3 – inflammation; 4 – necrosis; 5 – *Brachyspira* like structure

Csoportok (1)	Kórszövet-tani leletek (2)			
	gyulladás (3)	elhalás (4)	<i>Balantidium coli</i>	<i>Brachyspira</i> -szerű alak (5)
Kontroll	2,40	1,60	1,40	1,80
T2	1,50	0,67	1,00	0,83
Dys-1	2,00	0,17	0,17	1,17
Trial-D1	2,67	1,17	1,33	1,67

6. ÁBRA. Súlyos fokú fibrines-elhalásos vastagbélgyulladás (A); nagy számú *Brachyspira*-alak a nyálkahártyamirigyekben (B) Warthin–Starry, 400×

FIGURE 6. Severe fibrinonecrotic colitis (A); large members of *Brachyspira*-like structures (B)



ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérlet eredményei arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott fertőzési modell sikeresnek tekinthető, bár a jövőben kisebb változtatások javasolhatók. Így a proton-pumpagátlót nem kell feltétlenül az éheztetéssel együttesen alkalmazni. A T-2 toxin alkalmazása sikeres volt, de a toxin tényleges takarmánykoncentrációját időben és többször ellenőrizni kell. A kísérletet célszerű a fertőzést követő 10–14. napon lezárni.

A Dys-1 és Trial-D1 nem antibiotikum természetű takarmányadalékok a sertésdizentéria klinikai megjelenését nem tudták megakadályozni. A Dys-1 készítménnyel kezelt csoport ugyanakkor kórbonctanilag és a termelési eredmények tekintetében is jobb mutatókat ért el a többi vizsgált, sertésdizentériában megbetegedett csoporthoz képest. Ezért a Dys-1 adalékanyag további nagyobb számú állaton való vizsgálata a jövőben indokolt lehet a sertésdizentéria elleni védekezés hatékonyságának növelése és a veszteségek csökkentése érdekében.

A kutatási projekt a KMR_12-1-2012-0020 pályázata alapján valósult meg, a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága által kiadott PEI/001/400-4/2013 engedélyszámom, amit a MÁB is jóváhagyott.

A Dys-1 készítménnyel kezelt csoport kórbonctanilag és a termelési eredmények tekintetében is jobb mutatókat ért el a többi csoporthoz képest

IRODALOM

1. ALVAREZ, O. A. – MARTINEZ, L. F. J. et al.: Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2013. 10. 1927–1947.
2. ANNEKE, F. – DAVID, J. H. et al.: Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and other pathogenic *Brachyspira* species in chickens from laying flock with diarrhea or reduced production or both. *J. Clin. Microbiol.*, 2008. 593–600.
3. BLUNT, R. – MCOBIST, S.: On-Farm Insect Vector Carriage of Swine Pathogens – *Brachyspira* and *Lawsonia*. *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress, Durban, South Africa, 22–25 June 2008*. 291.
4. BOYE, M. – BALODA, S. B. et al.: Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet. Microbiol.*, 2001. 81. 33–40.
5. DESROSIERS, R.: Transmission of swine pathogens: different means, different needs. *Anim. Health Res. Rev.*, 2011. 12. 1–13.
6. Dewey, C. E.: Ration induced diarrhea in grower pigs. *J. Swine Health. Prod.*, 1993. 1. 16–21.

7. FRIES, R.: Conclusions and activities of previous expert groups: The scientific steering committee of the EU. *J. Vet. Med.*, 2004. 51. 403–407.
8. GALLIE, A. – CHESWORTH, M. et al.: Identification of Harmful Diphtheroid Communities on Pig Farms. In Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians, Dallas, TX, USA, 2009. March 7–10., 323.
9. HAMPSON, D. J. – CUTLER, R. – LEE, B. J.: *Virulent Serpulina* hyodysenteriae from a pig in a herd free of clinical swine dysentery. *Vet. Rec.*, 1992. 131. 318–319.
10. HAMPSON, D. J.: The Serpulina Story. In *Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, 17–21 September 2000. 1–5.
11. HARRIS, D. L. – GLOCK, R. D. et al.: Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 1972. 67. 61–64.
12. HARRIS, D. L. – ALEXANDER, T. J. L. et al.: Swine dysentery: studies of gnotobiotic pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*, *Bacteroides vulgatus*, and *Fusobacterium necrophorum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1978. 172. 468–471.
13. JACOBSON, M. – FELLSTRÖM, C. et al.: Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J. Med. Microbiol.*, 2004. 53. 273–280.
14. JANSSON, D. S. – JOHANSSON, K. E. et al.: *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly beta-hemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Vet. Microbiol.*, 2004. 53. 293–300.
15. JENSEN, N. S. – STANTON, T. B. – SWAYNE, D. E.: Identification of the swine pathogen *Serpulina hyodysenteriae* in rheas (*Rhea Americana*). *Vet. Microbiol.*, 1996. 52. 259–269.
16. JENSEN, T. K. – BOYE, M. et al.: Association of *Serpulina hyodysenteriae* with the colonic mucosa in experimental swine dysentery studied by fluorescent *in situ* hybridization. *Apmis*, 1998. 106. 1061–1068.
17. MEYER, R. C. – SIMON, J. – BYERLY, C. S.: The etiology of swine dysentery. I. Oral inoculation of germ-free swine with *Treponema hyodysenteriae* and *Vibrio coli*. *Vet. Pathol.*, 1974. 11. 515–526.
18. MEYER, R. C. – SIMON, J. – BYERLY, C. S.: The etiology of swine dysentery. II. Effect of a known microbial flora, weaning and diet on disease production in gnotobiotic and conventional swine. *Vet. Pathol.*, 1974. 11. 527–534.
19. MEYER, R. C. – SIMON, J. – BYERLY, C. S.: The etiology of swine dysentery. III. The role of selected Gram-negative obligate anaerobes. *Vet. Pathol.*, 1975. 12. 46–54.
20. MHOMA, J. R. – HAMPSON, D. J. – ROBERTSON, I. D.: A serological survey to determine the prevalence of infection with *Treponema hyodysenteriae* in Western Australia. *Aust. Vet. J.*, 1992. 69. 81–84.
21. MORENG, N. T. – QUARLES, C. L. et al.: Pathogenesis and lesions of swine dysentery induced by artificial methods in early weaned pigs. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 1980. 75. 1841–1844.
22. ÓZSVÁRI L.: Mennyi veszteséget okoznak a betegségek a sertéstartásban? V. Praxismenedzsmet konferencia Budapest, 2011. december 3. <http://www.alpha-vet.hu/pmk/images/stories/eloadas2011/Sertes%20szekcio/dr.%20Ozsvari%20-%20sert-svesztesg.pdf>
23. PHILLIPS, N. D. – LA, T. et al.: Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. *Vet. Microbiol.*, 2009. 134. 294–299.
24. RAFAI P. – MOLNÁR L. – GLÁVITS R. – TUBOLY S. – BÍRÓ H. – JAKAB L. – PAPP Z.: A takarmány szelén-, E- és B2-vitamin kiegészítésének hatása a növendék sertések immunreakciójára és a kísérletes *Treponema hyodysenteriae*-fertőzés eredményességére. III. A takarmány kiegészítés hatása a kísérletes *Treponema hyodysenteriae* fertőzés eredményességére. *Magy. Állatorv. Lapja*, 1989. 44. 37–41.
25. RAFAI, P. – BATA, Á. – VÁNYI, A. – PAPP, Z. – BRYDL, E. – JAKAB, L. – TUBOLY, S. – TÚRY E.: et al.: Effects of various levels of T-2 toxin on the clinical status, performance and metabolism of growing pigs. *Vet. Rec.*, 1995. 136. 485–489.
26. RAFAI, P. – TUBOLY, S. – BATA, A. – TILLY, P. – VÁNYI, A. – PAPP, Z. – JAKAB, L. – TÚRY, E.: Effect of various levels of T-2 toxin on the immune system of growing pigs. *Vet. Rec.*, 1995. 136. 511–514.
27. RUBIN, J. E. – COSTA, M. O. et al.: Reproduction of muco haemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following experimental inoculation with “*Brachyspira hamptonii*” strain 30446. *PLoS One*, 2013. 8. (2) e57146.
28. SAMEER, A. – BARGHOUTHI, B.: A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. *Indian J. Microbiol.*, 2011. 51. 430–444.
29. SIBA, P. M. – PETHICK, P. M. et al.: Pigs experimentally infected with *Serpulina hyodysenteriae* can be protected from developing swine dysentery by feeding them a highly digestible diet. *Epidemiol. Infect.*, 1996. 116. 207–216.
30. SONGER, J. G. – GLOCK, R. D. et al.: Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from sources other than swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1978. 172. 464–466.
31. TAYLOR, D. J. – ALEXANDER, T. J. L.: The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br. Vet. J.*, 1971. 127. 58–61.
32. TÚRY E. – RAFAI P. – TUBOLY S.: T-2 fuzáriotoxin hatása a sertés lymphoid szöveteire és egyes szerveire. *Magy. Állatorv. Lapja*, 1989. 44. 305–311.
33. WHIPP, S. C. – ROBINSON, I. M. et al.: Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.*, 1979. 26. 1042–1047.
34. WHITING, R. A. – DOYLE, L. P. et al.: Swine dysentery. *Bulletin*, 1937. 257. 1–15.

Közlésre érkező: 2015. márc. 5.