

FILTRAT FRA SOGØDNING KAN FOREBYGGE DIARRÉ HOS SMÅGRISE

Christina Larsen^a, Thomas Thymann^b & Poul Bækbo^c

^a *ph.d.-studerende, Københavns Universitet*

^b *Københavns Universitet*

^c *SEGES Innovation P/S, Den rullende Afprøvning*

STØTTET AF

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

Nyfødte pattegrise, der de første 6 levedage fik filtreret sofæces (gødning) givet med sonde i maven, havde en væsentligt lavere forekomst af diarré efter fravænning og en lavere dødelighed både i pattegriseperioden og de første 14 dage efter fravænning.

Sammendrag

Konklusionen på undersøgelsen er, at hvis pattegrise de første 6 dage af deres liv fik filtrat fra sogødning (fæces) (FFT= Fækal Filtrat Transplantation), så faldt dødeligheden frem til fravænning væsentligt. Efter fravænning blev forekomsten af diarré de første 14 dage efter fravænning halveret.

Undersøgelsen blev gennemført i en almindelig produktionsbesætning, hvor 15 grise fra 20 kuld indgik og blev fulgt fra fødsel til 14 dage efter fravænning (300 grise i alt).

Før forsøgsstart blev der indsamlet fæces (gødning) fra otte søer (paritet 3-6), som ikke havde modtaget antibiotika de seneste tre måneder før forsøgsstart. Donormaterialet blev sendt til Landbrug & Fødevarers Veterinære Laboratorium i Kjellerup til screening for en række smitstoffer. En uge før forsøgsstart blev der indsamlet donormateriale fra de af søerne, som var negative for disse smitstoffer.

Den indsamlede fæces blev fortyndet, hvorefter der blev foretaget en grov filtrering gennem gaze. Herefter blev opløsningen centrifugeret to gange og supernatanten (væskefasen) blev efter fortynding filtreret igennem et 0,45 µm filter, hvorefter man fik den færdige opløsning til Fækal Filtrat Transplantation (FFT).

I alt fik 15 grise i hvert af 10 kuld FFT-behandling (n = 10, 150 grise). De resterende 10 kuld var kontrol (n = 10, 150 grise), der fik en placebobehandling med fortyndingsvæske. Alle grise blev inokuleret en gang dagligt fra de var 1-6 dage gamle.

Grisene blev observeret dagligt og vejede på udvalgte tidspunkter.

Baggrund

Griseproduktionen har et mål om at øge pattegriseoverlevelsen og sikre fravæning af sunde grise samtidigt med, at antibiotikaforbruget sænkes.

Grise fødes uden antistoffer i blodet og uden bakterier i tarmen. Efter føring optager grisene antistoffer fra råmælk og somælk, som beskytter mod infektion. Samtidig koloniseres grisens tarm hurtigt af mikroorganismer fra nærmiljøet i farestien. I det grise kommer fra et beskyttet miljø i livmoderen, afhænger koloniseringen af grisens tarm især af, hvilke bakterier fra nærmiljøet, der kommer først, samt af de antistoffer, soen udskiller med råmælken og senere somælken. Særligt i de første dage efter fødsel sker markante skift i balancen mellem de mikroorganismer, som findes i tarmen (= tarmmikrobiotaen) (Damman et al. 2012; Lim et al. 2015; Lim, Wang, and Holtz 2016). Hvis råmælkens antistoffer ikke er tilstrækkeligt dækkende over for tilstedeværende patogener (sygdomsfremkaldende) mikroorganismer, risikerer grisen at blive syg (Holland 1990). Efter ca. 10-14 dage stabiliseres grisens tarmmikrobiota. Stabilisering af tarmmikrobiotaen er vigtig, da mikrobiotaen lever i samspil med værten og bidrager til værtens sundhed bl.a. ved at stimulere immunforsvaret og ved at danne fedtsyrer, vitaminer og antimikrobielle metabolitter (nedbrydningsprodukter).

Fækal Mikrobiota Transplantation (FMT) er udviklet som en metode, hvor der overføres komponenter fra fæces fra en rask donor til et individ med en tarmlidelse (Gianotti and Moss 2017; Damman et al. 2012). Konceptet bygger på, at fæces fra en rask donor indeholder uskadelige, men vigtige tarmbakterier, bakteriofager (vira, der angriber bakterier), bakterielle metabolitter, cellerester og ufordøjede foderpartikler, som alt sammen bidrager til at normalisere tarmens sundhed hos det syge individ.

Det overvejes også at anvende FMT forebyggende, ved at understøtte etableringen af en sund mikrobiota (bakteriebalance i tarmen), som kan hæmme kolonisering af tarmen med patogener (sygdomsfremkaldende) bakterier samt at faktorer fra FMT stimulerer immunforsvaret (Hu et al. 2018; Xiang et al. 2020). Teknikken anvendes også i den humane sektor, hvor den er godkendt til at behandle tarminfektioner forårsaget af *Clostridium (Clostridioides) difficile* (Damman et al. 2012; Gianotti and Moss 2017).

Ved FMT overføres der bakterier, virus, bakterielle metabolitter, bakteriofager, cellerester og ufordøjede foderpartikler fra ét individ til et andet. Københavns Universitet (KU) har undersøgt, om den samme gode effekt kan opnås, hvis man i stedet bruger Fækal Filtrat Transplantation (FFT), hvor bakterier, svampe og parasitter filtreres fra inden overførsel til modtageren. Filtreringen betyder, at der ikke overføres bakterier, som kan overføre sygdom (Brunse & Martin et al. 2016; Brunse et al. 2019). Forsøg med FFT på grise under laboratorieforhold har eftervist den gavnlige effekt af at bruge FFT. (Dahlman et al. 2021). Flere af disse laboratorieundersøgelser samt en pilotundersøgelse i en grisebesætning har vist, at FFT ser ud til at være en effektiv måde at reducere forekomsten af diarré (Larsen et al., ikke publiceret).

Formålet med denne undersøgelse var at undersøge, om tildeling af FFT den første uge efter fødsel er praktisk muligt under produktionsforhold, samt om dette kunne reducere forekomsten af diarré før og efter fravæning. Tilvækst og dødelighed før og efter fravæning indgik også i undersøgelsen.

Undersøgelsen blev gennemført af Københavns Universitet i 2022 og var finansieret af Svineafgiftsfonden og Forskningsrådet for Teknologi og Produktion.

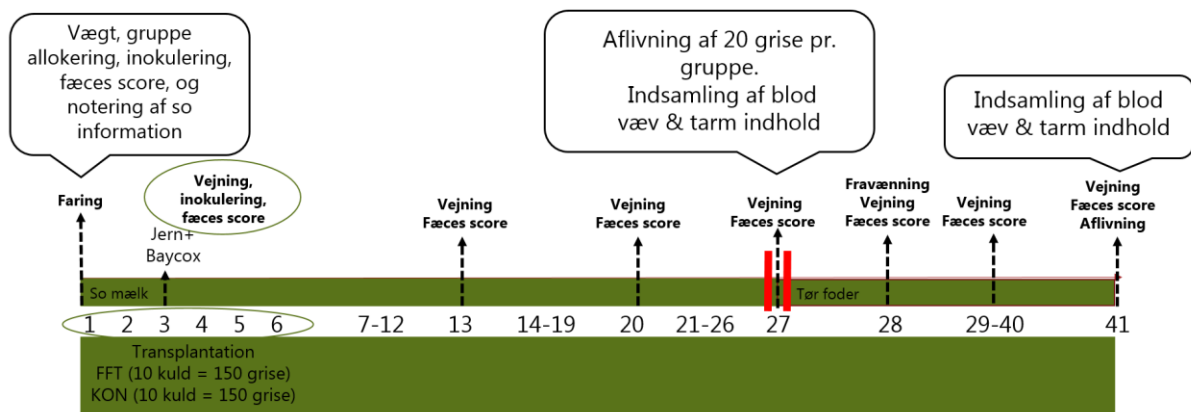
Materialer og metoder

Forsøgsdesign

Forsøget foregik i en konventionel smågriseproduktion (blå SPF-status +Myc). Femten grise i hvert af 20 kuld blev øremærket efter faring. De resterende grise uden øremærke blev rykket til ammesøer, hvorefter kuldene blev låst.

Forsøgsopstillingen er skitseret i figur 1. I alt blev 10 kuld allokeret til FFT-behandling (n = 10, 150 grise) og de resterende 10 kuld blev allokeret til kontrol (n = 10, 150 grise) og modtog en placebobehandling – se figur 1. Alle grise blev inokuleret en gang dagligt fra dag 1 til 6. På dagene 1, 6, 14, 21, 27, 34 og 41 blev alle grisene vejjet individuelt, og fik en klinisk score (se appendiks 1) samt en fæces-score. Fæces-scoren blev givet på baggrund af, om grisen havde diarré (score 1) eller ikke havde diarré (score 0). Diarré blev karakteriseret som tilsmudsning på bagparten. På dag 2 fik grisene en intramuskulær injektion med jern og Baycox oralt (gennem munden). På dag 27 blev 20 tilfældigt udvalgte grise fra hver gruppe aflivet, og der blev udtaget materiale fra disse til videre undersøgelser (ikke medtaget i denne Meddelelse). De resterende grise blev fravænnet på dag 28 til henholdsvis seks FFT-stier og fem kontrolstier. Efter fravæning havde grisene adgang til drikkepipler med vand tilsat myresyre og *ad libitum adgang* til tørfoder. Alle grise blev tilset dagligt af personalet i besætningen. På dag 41 (14 dage efter fravæning) blev alle resterende grise fra både kontrol- og FFT-gruppen aflivet, og der blev udtaget materiale til videre undersøgelser (ikke medtaget i denne Meddelelse).

Grisene modtog ikke probiotika eller medicinsk zink under forsøget. Hvis grisene havde behov for antibiotikabehandling, blev de taget ud af forsøget. Hvis en so krævede antibiotikabehandling, blev kullet flyttet til ny so.



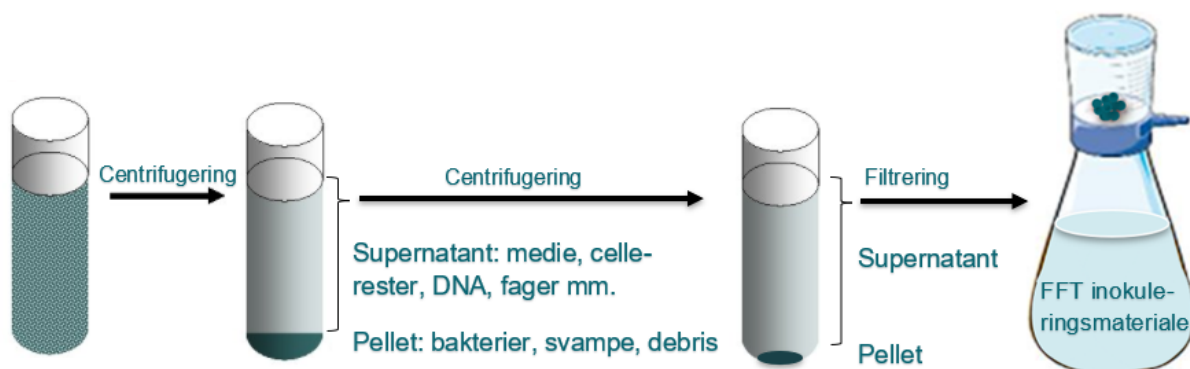
Figur 1: Skitse over forsøgsdesign. FFT = fækal filtrat transplantation. KON= kontrol.

Donorudvælgelse, screening og forberedelse af inokulat (FFT)

Før forsøgsstart blev der indsamlet fæces (gødning) fra otte højdrægtige søer (paritet 3-6), som ikke havde modtaget antibiotika de seneste tre måneder før forsøgsstart. Donormaterialet blev sendt til Landbrug & Fødevarers Veterinære Laboratorium i Kjellerup til screening for følgende smitstoffer (patogener): rotavirus, *E. coli* F4 eller F18, *Lawsonia* og *Brachyspira pilosicoli*, samt for ormeæg og

coccidier. En uge før forsøgsstart blev der indsamlet donormateriale fra de otte af søerne, der var negative for disse smitstoffer.

Den indsamlede fæces blev fortyndet 1:6 i 3,3 % SM-buffer (200 mM NaCl₂, 10 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5), hvorefter der blev foretaget en grov filtrering med gaze. Herefter blev opløsningen centrifugeret ved 15.000xg ved 4 °C i 10 min. Supernatanten blev overført til et nyt reagensglas og centrifugeringen blev gentaget. Herefter blev supernatanten (væsken over bundfaldet) fortyndet med 3,3 % SM-buffer til det kompenserede for det fjernede bundfald. Denne opløsning blev filtreret igennem et 0,45 µm filter, hvorefter man fik den færdige opløsning til FFT (figur 2). Et filter med denne porestørrelse fjerner langt de fleste bakterier, men tillader virus og fager (bakterievirus) at følge med over i filtratet. Behandlingsgruppen (FFT) fik 6 ml af opløsningen hver dag, svarende til 1 gram fæces. Kontrolgruppen fik tilsvarende volumen (et gram 3,3 % SM-buffer). Selve inokuleringen blev foretaget med sonde, som gennem munden blev ført ned i grisens mave.



Figur 2: Fra opslæmmet fæces til FFT-inokuleringsmateriale.

Fodring

Fra faring til fravæning havde alle grisene adgang til mælkekopper (Pump'n'grow AB-NEO). Fra dag 10 fik pattegrisene tildelt tørfoder på gulvet én gang dagligt (samme blanding som efter fravæning). Efter fravæning blev grisene fodret *ad libitum*. Fodersammensætningen fremgår af tabel 1.

Tabel 1. Næringsstof sammensætning af den anvendte tørfoderblanding.

Råvaresammensætning	%
Vårbyg	10,0
Hvede	53,7
Fiskemel	5,0
HP 300*	10,0
Svinefedt	3,3
B2B 25927 konc 18 plus**	18,0
Analyseret indhold	% af tørstof
Råprotein	19,2
Råfedt	5,5
St. ford. lysin	13,0
St. ford. methionin	4,8

* HP 300 er et sojaprodukt fra Hamlet Protein

** B2B 25927 konc. 18 plus er en vitamin- og mineralblanding

Statistisk analyse

Data blev analyseret med det statistiske program R (version 2022.02.1 + 461, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) og grafiske fremstillinger blev lavet i GraphPad Prism (version 9.3.1 (471), GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) eller Microsoft Office power point.

Gentagne målinger over tid for kontinuerlige variabler (kropsvægt) blev analyseret ved hjælp af lineær mixed model med mRI. Gennemsnitlig daglig tilvækst blev analyseret ved hjælp af lineære modeller. Modellerne blev analyseret med en tovejs ANOVA. Diarréprævalens blev for hver dag analyseret med Fisher's exact-test eller Pearson's chi-square test. I modellerne indgik kovariater som behandling, køn, fødselsvægt (diarréprævalens) og so som en tilfældig effekt (kun i modeller for dieperioden). Modelvalidering blev udført ved at teste normalitet og varianshomogenitet af residualerne. Hvis antagelserne ikke blev accepteret, blev data log-transformeret for at opfylde kriterierne. Ikke-parametriske analyser blev brugt, når data ikke kunne opfylde kriterierne. Data præsenteres som middel med standardafvigelse. P-værdier under 0,05 blev betragtet som statistisk signifikante, og P-værdier under 0,10 blev betragtet som en tendens.

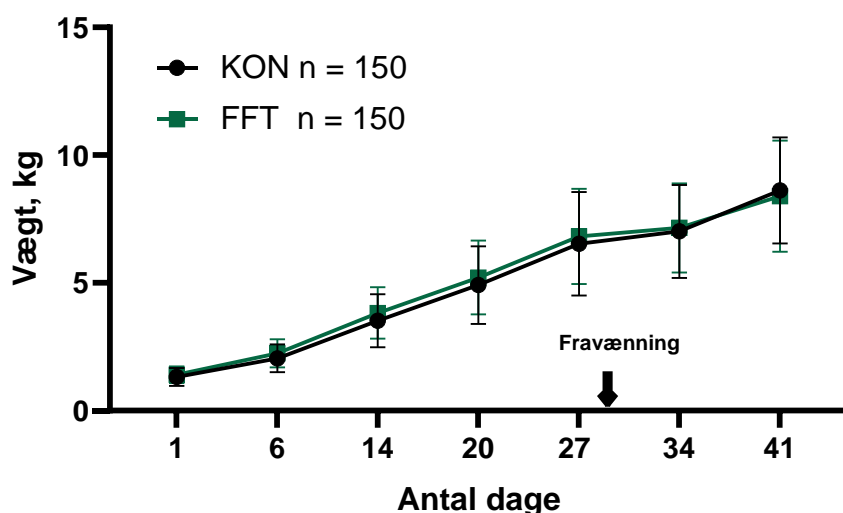
Resultater og diskussion

I det følgende er resultaterne angivet for grisenes vækst, forekomsten af diarré og dødeligheden i forsøgsperioden.

Vækst

Der var ikke statistisk sikker forskel i grisenes vækst fra fødsel til dag 41 mellem de to grupper (figur 3).

I laktationsperioden var der en daglig tilvækst på 198 g/d i kontrolgruppen mod 207 g/d i FFT-gruppen og fra fravænnning til dag 41 var den daglige tilvækst på 120 g/d i begge grupper.



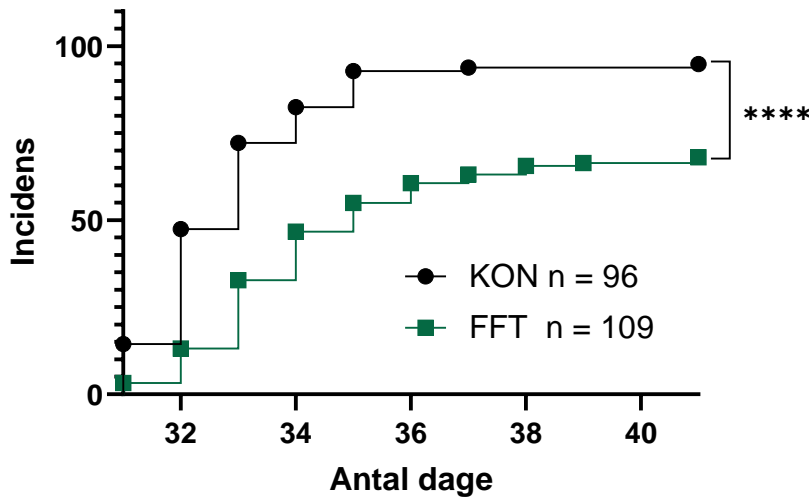
Figur 3: Grisenes vækst i de to grupper i forsøget.

Forekomst af diarré

I det følgende er medtaget både diarréincidensen (forekomst af nye tilfælde) og diarréprævalensen (forekomst af tilfælde på et givet tidspunkt).

Diarréincidens:

Der var væsentlig og signifikant forskel i diarréincidensen efter fravæning mellem de to grupper (figur 4). Diarréincidensen var både i laktationsperioden og i fravænningsperioden signifikant højere i kontrolgruppen end i FFT-gruppen ($P=0,04$). Odds for at udvikle diarré var således 2,4 gange højere i kontrolgruppen end i FFT-gruppen.

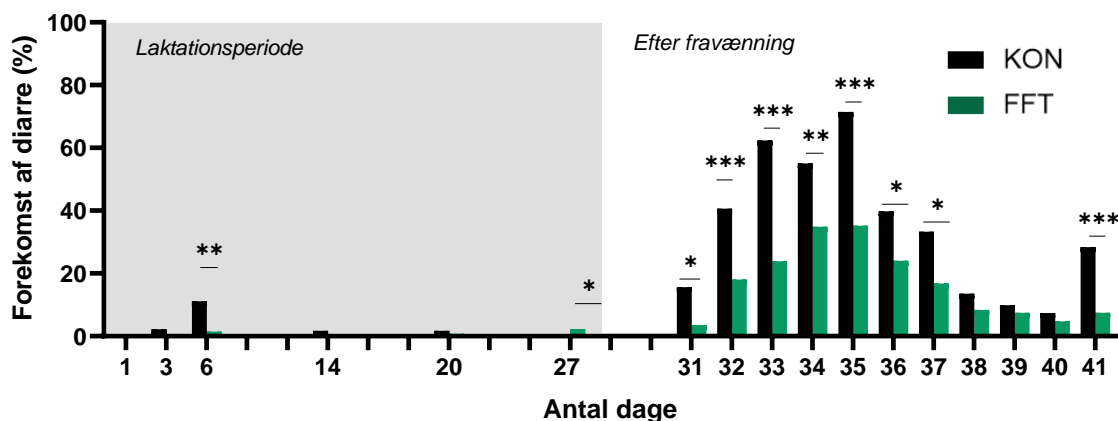


Figur 4: Nye tilfælde af diarré efter fravæning i de to grupper i forsøget.

Også i antallet af dage, hvor den enkelte gris havde diarré, var der en forskel, således at varigheden af diarré var kortest i FFT-gruppen. I laktationsperioden var varigheden af diarré $1,24 \text{ dag} \pm 0,56$ i kontrolgruppen mod $1,17 \text{ dag} \pm 0,41$ i FFT-gruppen. ($P=0,017$). I fravænningsperioden var diarrévarigheden $3,45 \text{ dag} \pm 1,87$ i kontrolgruppen mod $1,82 \text{ dag} \pm 1,60$ i FFT-gruppen ($P=0,0002$).

Diarréprævalens:

Grise med diarré forekom næsten udelukkende efter fravæning, hvor FFT-gruppen havde en væsentligt og signifikant lavere forekomst på 8 ud af de 11 dage med registrering af diarréforekomst. (figur 5).



Figur 5: Tilfælde af diarré i de to grupper før og efter fravæning. Angives som %-del af grisene i de to grupper, som havde tilsølede bagben på de pågældende dage (%).

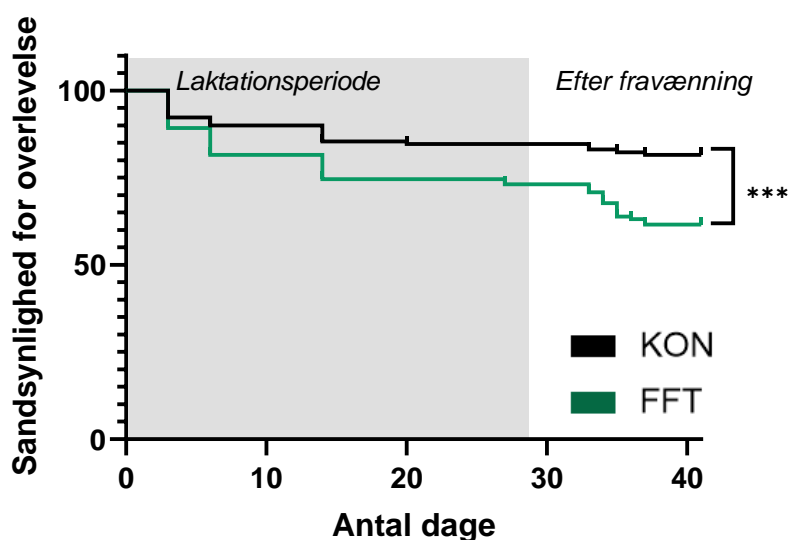
Dødelighed

Der var en statistisk sikkert lavere dødelighed i FFT-gruppen end i kontrolgruppen både før og efter fravæning (tabel 2 og figur 6). I laktationsperioden fandtes en relativ reduktion i dødeligheden på 43 % i FFT-gruppe i forhold til kontrolgruppen. I fravænningsperioden var den relative reduktion på 69 %.

Tabel 2. Dødelighed i % før og efter fravæning.

Dag	Kontrol	FFT	P-værdi
Antal indvejede grise	150	150	
Døde i laktationsperioden	22,7 %	12,7 %	0,01
Antal fravænnede grise	96	111	
Døde efter fravæning	15,6 %	5,31 %	0,01

Sandsynligheden for overlevelse var således signifikant højere for FFT-grisene end for kontrolgrisene (figur 6).



Figur 6: Sandsynlighed for at overleve i de to grupper i forsøget.

Pattegrise, der får filtreret gødning fra søer, overlever bedre både før og efter fravæning, og de har en lavere forekomst af diarré efter fravæning.

Konklusion

Undersøgelsen er gennemført i en traditionel produktionsbesætning, og viser, at hvis pattegrise de første 6 dage af deres liv dagligt indgives filtrat fra søgødning (fæces), så mindskes deres dødelighed både før og efter fravæning signifikant. Det samme gør forekomsten af diarré de første 14 dage efter fravæning, som i runde tal halveres.

FFT ser således ud til at have positive effekter under produktionsforhold. Det skal afklares, om samme effekt kan opnås ved et mindre antal inokulationer af pattegrisene, f.eks. en eller to gange. Det skal endvidere undersøges, hvorledes konceptet med gødningsfiltrater kan benyttes under hensyntagen til gældende foderlovgivning.

Referencer

- Brunse, A., Martin, L., Cilieborg, M., Christensen, L., Thymann, T., Pieper, R., & Sangild, P.T. 2016. "Fecal microbiota transplantation protects against necrotizing enterocolitis but increases overall mortality in preterm newborn pigs." *European Journal of Pediatrics*, 175(11), 1731-1732. Doi: 10.1007/s00431-016-2785-8.
- Brunse, A., Martin, L., Rasmussen, T.S., Christensen, L., Cilieborg, M.S., Wiese, M., Khakimov, B., Pieper, R., Nielsen, D.S. & Sangild, P.T. 2019. 'Effect of fecal microbiota transplantation route of administration on gut colonization and host response in preterm pigs', *The ISME Journal*, 13: 720-733.
- Dahlman, S., Avellaneda-Franco, L. & Barr, J.J. 2021. Phages to shape the gut microbiota? *Current Opinion in Biotechnology* 68:89–95. doi: 10.1016/j.copbio.2020.09.016.
- Damman, C.J, Miller, S.I., Surawicz, C.M. & Zisman, T.L. 2012. 'The microbiome and inflammatory bowel disease: is there a therapeutic role for fecal microbiota transplantation?', *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 107: 1452-1459.
- Gianotti, R.J. & Moss, A.C. 2017. 'Fecal microbiota transplantation: from *Clostridium difficile* to inflammatory bowel disease', *Gastroenterology & Hepatology*, 13: 209-213.
- Holland, R.E. 1990. 'Some infectious causes of diarrhea in young farm animals', *Clinical Microbiology Reviews*, 3: 345-375.
- Hu, L., Geng, S., Li, Y., Cheng, S., Fu, X., Yue, X. & Han, X. 2018. 'Exogenous fecal microbiota transplantation from local adult pigs to crossbred newborn piglets', *Frontiers in Microbiology*, 8: 2663, doi: 10.3389/fmicb.2017.02663.
- Lim, E.S., Wang, D., & Holtz, L.R. 2016. 'The bacterial microbiome and virome milestones of infant development', *Trends in Microbiology*, 24: 801-810.
- Lim, E.S., Zhou, Y., Zhao, G., Bauer, I.K., Droit, L., Ndao, I.M., Warner, B.B., Tarr, P.I., Wang, D., & Holtz, L.R. 2015. 'Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants', *Nature Medicine*, 21: 1228-1234.
- Xiang, Q., Wu, X., Pan, Y., Wang, L., Cui, C., Guo, Y., Zhu, L., Peng, J., & Wei, H. 2020. 'Early-life intervention using fecal microbiota combined with probiotics promotes gut microbiota maturation, regulates immune system development, and alleviates weaning stress in piglets', *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 503, doi: 10.3390/ijms21020503.

Deltagere

Dyrlæge Marie Louise Herman-Bang (tidligere ansat ved SEGES Innovation)

NAV nr.: 1292

//KARL//

Dyregruppe: Patte grise og smågrise
Fagområde: Sundhed
Nøgleord: Diarre, dødelighed, forebyggelse

Appendiks

Klinisk score

Score	Beskrivelse
1. Normal	- Normal adfærd
2. Moderate symptomer	- Moderat dehydrering - Langsom reaktion - Sitren - (Rektaltemperatur >40°C (I kombination med andre moderate symptomer))
3. Svære symptomer	- Grisen kan ikke bevæge sig eller opmuntres til at bevæge sig - Svær dehydrering - Blå snude - Blodig diarré - Ændret respiration - Hvis en gris ikke kan rejse sig eller ligger helt fladt - (Rektaltemperatur <39 °C (normal rektaltemperatur er 39,2-39,3°C))



Tlf.: 87 40 50 00

info@seges.dk

Ophavsretten tilhører SEGES Innovation P/S. Informationerne fra denne hjemmeside må anvendes i anden sammenhæng med kildeangivelse.

Ansvar: Informationerne på denne side er af generel karakter og søger ikke at løse individuelle eller konkrete rådgivningsbehov.

SEGES Innovation P/S er således i intet tilfælde ansvarlig for tab, direkte såvel som indirekte, som brugere måtte lide ved at anvende de indlagte informationer.