

UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI EDEMSKE  
BOLEZNI IZ VZORCEV USTNE TEKOČINE  
TEKAČEV IN PITANCEV**

**ASSESSING THE PRESENCE OF EDEMA DISEASE IN  
SAMPLES OF ORAL FLUID OF GROWERS AND  
FATTENERS**

Ana Trbovc

Ljubljana, 2024



UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 543.544-415.4:591.2:591.431:616-005.98(043.2)

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI EDEMSKE BOLEZNI IZ  
VZORCEV USTNE TEKOČINE TEKAČEV IN PITANCEV**

**ASSESSING THE PRESENCE OF EDEMA DISEASE IN  
SAMPLES OF ORAL FLUID OF GROWERS AND  
FATTENERS**

Ana Trbovc

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom izr. prof. dr. Marine Štukelj na Kliniki za prežvekovalce in prašiče.

Ljubljana, 2024

## IZVLEČEK

**Ključne besede:** edemska bolezen; ustna tekočina; *E. coli*; prevalenca; biovarnost

Z neinvazivnim vzorčenjem ustne tekočine tekačev in pitancev smo ugotavljali prevalenco edemske bolezni v skupno 37 slovenskih intenzivnih rejah. Na podlagi rezultatov RT-PCR analize glede prisotnosti in količine nukleinske kisline Stx2e toksina v vzorcih ustne tekočine prašičev smo ugotavljali prevalenco edemske bolezni v rejah prašičev. Rezultate vprašalnikov za rejce smo primerjali s prevalenco edemske bolezni v štirih starostnih kategorijah tekačev in pitancev ter primerjali prevalenco glede na velikost in vrsto reje, izvor krme, izvajanje karantene in glede na predhodno prisotnost edemske bolezni v reji. V Sloveniji je 64,9 % prevalenca edemske bolezni, povzročene s sevi *E. coli*, ki izločajo Stx2e toksin. Rezultati statistične analize so pokazali, da je prevalenca edemske bolezni statistično značilno povezana z vrsto reje in izvorom krme, ne pa tudi z velikostjo reje, izvajanjem karantene in predhodno prisotnostjo edemske bolezni. V prihodnje bodo potrebne raziskave, ki bodo določile, kolikšen delež edemske bolezni povzroča patotip EDEC in koliko ostali sevi *E. coli*, ki imajo prav tako ustrezen virulentni faktor za izločanje Stx2e toksina.

## **ABSTRACT**

**Key words:** edema disease; oral fluid; *E. coli*; prevalence; biosecurity

The aim of this study was to assess the prevalence of edema disease in 37 Slovenian commercial farms by non-invasive sampling of oral fluid from growers and fatteners. Based on the results of real-time PCR detection of Stx2e toxin in the samples of pigs' oral fluid and the results of questionnaires, we compared the prevalence of edema disease in four age groups of growers and fatteners and the prevalence of edema disease depending on the size and type of farm, the origin of feed, the presence of quarantine and outbreaks of edema disease in the past. In Slovenia, the prevalence of edema disease caused by *E. coli* strains capable of producing the toxin Stx2e is 64.9 %. The results of the statistic analysis have shown that the prevalence is statistically significantly related to the type of farm and the origin of the feed and is not statistically significantly related to the size of the farm, the presence of quarantine and edema outbreaks in the past. Further studies will be needed in the future to assess the prevalence of edema disease caused by EDEC patotypes, and edema disease caused by other *E. coli* strains that also have the ability to produce Stx2e toxin.

## KAZALO VSEBINE

|  |      |
|--|------|
| <b>IZVLEČEK</b> .....  | ii   |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | iii  |
| <b>KAZALO VSEBINE</b> .....  | iv   |
| <b>KAZALO TABEL</b> .....  | vi   |
| <b>KAZALO SLIK</b> .....   | vi   |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV</b> .....   | viii |
| <b>1 UVOD</b> .....  | 1    |
| 1.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....  | 1    |
| 1.2 DELITEV <i>E. COLI</i> .....   | 2    |
| <b>1.2.1 Serotipizacija</b> .....  | 2    |
| <b>1.2.2. Virulentni faktorji</b> .....  | 2    |
| 1.3 PATOGENI SEVI <i>E. COLI</i> .....   | 3    |
| 1.4 EDEMSKA BOLEZEN .....  | 4    |
| <b>1.4.1 <i>E. coli</i> kot povzročiteljica edemske bolezni</b> .....                | 4    |
| <b>1.4.2 Epidemiologija edemske bolezni</b> .....                                    | 5    |
| <b>1.4.3 Načini okužbe in patogeneza edemske bolezni</b> .....                       | 6    |
| <b>1.4.4 Klinična znamenja edemske bolezni</b> .....                                 | 8    |
| <b>1.4.5 Patoanatomske, patohistološke in patocitološke lezije</b> .....             | 9    |
| <b>1.4.6 Prirojena in pridobljena imunost</b> .....                                  | 11   |
| <b>1.4.7 Diagnostika edemske bolezni</b> .....                                       | 11   |
| <b>1.4.8 Diferencialne diagnoze</b> .....  | 15   |
| <b>1.4.9 Zdravljenje edemske bolezni</b> .....                                       | 15   |
| <b>1.4.10 Preventiva edemske bolezni</b> .....                                       | 16   |
| 1.4.10.1 Tehnologija reje .....  | 16   |
| 1.4.10.2 Preventivno cepljenje .....   | 19   |
| 1.5 EDEMSKA BOLEZEN V SLOVENIJI IN SVETU TER PREDHODNE RAZISKAVE<br>PREVALENCE ..... | 21   |
| <b>2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE</b> .....  | 22   |
| <b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....   | 23   |
| 3.1 MATERIALI .....  | 23   |
| <b>3.1.1 Reje</b> .....  | 23   |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.1.2 Ustna tekočina in Verocheck®.....         | 23        |
| 3.1.3 Vprašalnik za rejce.....                  | 26        |
| 3.2 METODE.....                                 | 27        |
| 3.2.1 PCR test.....                             | 27        |
| 3.2.2 Statistična analiza.....                  | 28        |
| <b>4 REZULTATI.....</b>                         | <b>30</b> |
| 4.1 REZULTATI PCR.....                          | 30        |
| 4.2 REZULTATI ANKET.....                        | 32        |
| 4.3 STATISTIČNA ANALIZA.....                    | 34        |
| 4.3.1 Velikost reje.....                        | 34        |
| 4.3.2 Vrsta reje.....                           | 36        |
| 4.3.3 Krma.....                                 | 37        |
| 4.3.4 Karantena.....                            | 38        |
| 4.3.5 Predhodni izbruhi edemske bolezni.....    | 39        |
| 4.3.6 Prevalenca glede na starost prašičev..... | 40        |
| <b>5 RAZPRAVA.....</b>                          | <b>41</b> |
| <b>6 SKLEPI.....</b>                            | <b>46</b> |
| <b>7 POVZETEK.....</b>                          | <b>46</b> |
| <b>8 ZAHVALE.....</b>                           | <b>46</b> |
| <b>9 LITERATURA.....</b>                        | <b>47</b> |
| <b>10 PRILOGE.....</b>                          | <b>52</b> |

## KAZALO TABEL

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Rezultati RT-PCR analize vzorcev ustne tekočine/ Table 1: Results of RT-PCR analysis of oral fluid samples .....  | 31 |
| Tabela 2: Podatki o rejah in njihovi tehnologiji/Table 2: Information on farms and their technology .....   | 33 |
| Tabela 3: Prevalenca edemske bolezni glede na velikost farme/Table 3: Prevalence of edema disease depending on the size of the farm .....   | 34 |
| Tabela 4: Prevalenca edemske bolezni glede na tip reje/Table 4: Prevalence of edema disease depending on the type of the farm .....   | 36 |
| Tabela 5: Prevalenca edemske bolezni glede na izvor krme/Table 5: Prevalence of edema disease depending on the origin of the feed .....   | 37 |
| Tabela 6: Prevalenca edemske bolezni glede na izvajanje karantene/Table 6: Prevalence of edema disease depending on the presence of quarantine .....  | 39 |
| Tabela 7: Prevalenca edemske bolezni glede na prisostnost izbuhov edemske bolezni v preteklosti/Table 7: Prevalence of edema disease depending on the outbursts of edema disease in the past..... | 40 |
| Tabela 8: Primerjava prevalece edemske bolezni med starostnimi skupinami prašičev/Table 8: Comparisson of the prevalence of edema disease among the age groups of pigs.....                       | 41 |

## KAZALO SLIK

|   |    |
|---|----|
| Slika 1: Diagnostični komplet Verocheck/Picture 1: diagnostic kit Verocheck .....                                 | 24 |
| Slika 2: FTA kartica/Picture 2: FTA card .....  | 24 |
| Slika 3: Prašiči žvečijo bombažno vrv/Picture 3: The pigs are chewing the cotton rope.....                        | 25 |
| Slika 4: Vzorčenje ustne tekočine prašičev/Picture 4: Oral fluid sampling in pigs .....                           | 25 |
| Slika 5: Nanos vzorca ustne tekočine na FTA kartice/Picture 5: Transferring the pig oral fluid on FTA cards ..... | 26 |

## **PRILOGE**

Priloga 1: Vprašalnik o edemski bolezni

## SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ABI prism – sistem za detekcijo produktov PCR v realnem času

AE lezije – pritrditvene in izničuječe lezije (ang. attaching and effacing lesions)

AIDA – adhezin, vpleten v difuzno adherenco (ang. adhesin involved in diffuse adherence)

CFU/g – število kolonij bakterij na gram vzorca (ang. colony forming unit per gram)

CT – kolera toksin (ang. cholera toxin)

Ct – število ciklov v PCR reakciji, potrebnih, da fluorescenčni signal preseže bazalno vrednost (ang. cycle threshold)

DEAE – dietilaminoetil (ang. diethylaminoethyl)

dNTP – deoksinukleotidni trifosfati (ang. deoxynucleotide triphosphates)

dUTP – deoksinukleotidni trifosfat z uracilom

EAST 1 – toksin, ki ga izloča podtip enteroagregativne *E. coli*

*E. coli* – bakterija *Escherichia coli*

EDEC – *E. coli*, ki povzroča edemsko bolezen

EHEC – enterohemoragična *E. coli*

ELISA – encimska imunoabsorpcijska preiskava (ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

EPEC – enteropatogena *E. coli*

ETEC – enterotoksigena *E. coli*

ETT2 – tip 3 sekrecijskega sistema 2 bakterije *E. coli* (ang. *Escherichia coli* type III secretion system 2)

ExPEC – ekstraintestinalna patogena *E. coli*

FAM – fluorescenčno barvilo (ang. fluorescein amidites)

FTA – kartice za ohranjanje nukleinske kisline v vzorcu (ang. Flinders Technology Associates)

FUT-1 – gen, ki kodira  $\alpha$ -1,2-fukoziltransferazo

GALT – črevesno limfatično tkivo (ang. gut-associated lymphoid tissue )

Gb4 – glikolipid celične membrane eritrocitov

IL-1 – interlevkin 1

IL-6 – interlevkin 6

LPS – lipopolisaharid

LT – termolabilen toksin

PAIs – otočki patogenosti (ang. pathogenicity islands)

PCR – polimerazna verižna reakcija (ang. polymerase chain reaction)

PED – prašičja virusna driska (ang. porcine epidemic diarrhea)

PEDV – virus prašičje virusne driske (ang. porcine epidemic diarrhea virus)

PWD – poodstavitvena driska (ang. post-weaning diarrhoea)

Rn – količnik fluorescenčnega signala in signala pasivnega referenčnega barvila (ang. normalized reporter value)

$\Delta Rn$  – razlika med Rn vrednostjo vzorčne reakcije in Rn vrednostjo spodnje meje signala aparature

ROX – barvilo karboksi-X-rodamin (ang. carboxy-X-rhodamine)

RT-PCR – polimerazna verižna reakcija v realnem času (ang. real time - polymerase chain reaction)

ST – termostabilen toksin

STEC – *E. coli* s sposobnostjo tvorbe shiga toksina (ang. shiga toxin producing *E. coli*)

Stx2e – shiga toksin tip 2e

TET – fluorescenčno barvilo tetraklorofluorescein (ang. tetrachlorofluorescein)

TGE – virusno vnetje želodca in črevesja pri prašičih (ang. transmissible gastroenteritis)

TNF- $\alpha$  – tumorski nekrozni faktor alfa (ang. tumor necrosis factor alpha)

VTEC – *E. coli* s sposobnostjo tvorbe verotoksina (ang. verotoxin producing *E. coli*)

VT2e – verotoksin tip 2e

PRRS – prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom (ang. porcine reproductive and respiratory syndrome)

UNG – uracil DNA glikozilaza (ang. uracil DNA glycosylase)

UTI – infekcija sečil (ang. urinary tract infection)

ZnO – cinkov oksid

## 1 UVOD

### 1.1 *ESCHERICHIA COLI*

V družino Enterobacteriaceae, v katero spada *Escherichia coli* (v nadaljevanju *E. coli*), so razvrščene po Gramu negativno obarvane fakultativno anaerobne paličaste bakterije. Kolonije *E. coli* na bakterijskih gojiščih zrastejo po 15-urni inkubaciji na 41 °C (Tseng in sod., 2014) in so lahko gladke, hrapave ali mukoidne. Bakterija ima flagele s premerom 1 µm in dolgo preživi v zunanjem okolju z nizko temperaturo in visoko vlago.

*E. coli* so glede na prisotnost virulentnih faktorjev razdeljene na nepatogene in patogene seve, razlikovanje med obema skupinama lahko otežuje interpretacijo rezultatov diagnostičnih testov (Fairbrother in Nadeau, 2019). Le manjši del sevov je patogenih zaradi izločanja virulentnih faktorjev. Nekateri sevi imajo virulentne gene v kombinacijah, ki zaenkrat še nimajo znane povezave z boleznimi, in se lahko obravnavajo kot potencialno patogene (ECL, 2004).

Nepatogeni sevi *E. coli* predstavljajo 90 % vseh *E. coli* v črevesju toplokrvnih živali in so pomemben del normalne aerobne črevesne mikroflore prašičev. Z gostiteljem vzdržujejo komenzalni odnos, kjer imata korist tako gostitelj kot bakterija (ECL, 2004; Kaper in sod., 2004; Fairbrother in Nadeau, 2019; Ramos in sod., 2020; Do in sod., 2022). Patogene *E. coli* se od nepatogenih razlikujejo po tem, da imajo adhezijske faktorje za kolonizacijo tankega črevesja in vsaj en eksotoksin, kar omogoča nastanek bolezni (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Vsem sevom *E. coli* ne glede na patogenost je skupno, da lahko imajo gene za odpornost na antibiotike (ECL, 2004). Prav tako lahko dolgo preživijo v zunanjem okolju z nizko temperaturo in visoko vlago, zato sta rutinsko čiščenje in dezinfekcija običajno neučinkovita (Fairbrother in Nadeau, 2019). Po čiščenju in dezinfekciji prasilišč z benzalkoniumkloridom, glutaraldehydom, formaldehydom in D50® (univerzalno razkužilo za površine in opremo) niso zaznali povečane odpornosti *E. coli* na razkužila ali antibiotike (Maertens in sod., 2020).

## 1.2 DELITEV *E. COLI*

Znotraj vrste *E. coli* obstaja poleg delitve na nepatogene in patogene seve več različnih razdelitev na podskupine glede na površinske antigene bakterije ali glede na gene, ki kodirajo virulentne faktorje (Fratamico in sod., 2016; Fairbrother in Nadeau, 2019).

### 1.2.1 Serotipizacija

Popolna serotipizacija bakterije je klasična metoda razvrstitve z uporabo antiserumov proti površinskim antigenom *E. coli* in vključuje somatski (O ali polisaharid), kapsularni oziroma mikrokapsularni (K), flagelarni (H) in fimbrijski (F) antigen (Fairbrother in Nadeau, 2019; Baek in sod., 2023). Sevi *E. coli*, ki imajo skupen en antigen, se imenujejo seroskupine (ang. serogroups). Sevi s skupno kombinacijo antigenov se imenujejo serotipi (Fairbrother in Nadeau, 2019). Seroskupine se lahko določajo poleg uporabe testa aglutinacije z zajčjim antiserumom proti specifičnim površinskim antigenom tudi z uporabo PCR reakcije (ang. polymerase chain reaction) ali drugimi molekularnimi metodami (Byun in sod., 2022).

### 1.2.2. Virulentni faktorji

Pri razvrstitvi *E. coli* so danes bolj kot tradicionalna razdelitev na O in H serotipe v uporabi virulentni faktorji. Virulentni faktorji ali faktorji virulence so geni, ki kodirajo patogene lastnosti in so neposredno povezani s patogenezo bolezni. Imajo jih samo patogeni sevi *E. coli*. Uporabljajo se za diagnostiko z molekularnimi metodami. V različnih kombinacijah določajo patotipe glede na mehanizme virulence (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Najpomembnejši patotipi pri prašičih so enterotoksični patotip (ETEC), verotoksični patotip (VTEC ali STEC), enteropatogeni patotip (EPEC) in ekstraintestinalni patogeni patotip (ExPEC). STEC patotip se deli na podskupino patotipov, ki povzročajo edemsko bolezen in fatalni šok (EDEC), ter na podskupino enterohemoragičnih patotipov (EHEC). Patotip ETEC izloča najmanj en enterotoksin, ki povzroča sekretorno diarejo prašičev. Enterotoksini so lahko termolabilni (LT) ali termostabilni (ST). Obstaja tudi delitev na virotipe na podlagi kombinacij virulentnih faktorjev za posamezen izolat (Fairbrother in Nadeau, 2019; Byun in sod, 2022; Pokharel in sod., 2023). Edemsko bolezen torej povzroča patotip STEC z virotipom Stx2e:F18ab:(AIDA) in hemolizin pozitivnimi O serotipi 138, 139 in 141 (ECL, 2004). AIDA (ang. adhesin involved in diffuse adherence) je avtotransportni glikozilirani protein na zunanji

membrani, ki sodeluje pri pritrjevanju bakterije na gostiteljsko celico (Charbonneau in Mourez, 2008).

### 1.3 PATOGENI SEVI *E. COLI*

Patogeni sevi *E. coli* pri prašičih povzročajo različna bolezenska stanja, ki so odvisna od starosti okuženega gostitelja. Ekonomsko najpomembnejše oblike so neonatalna driska, driska sesnih pujskov ter poodstavitvena driska ali poodstavitvena enterična kolibaciloza (PWD, ang. post-weaning diarrhoea) in edemska bolezen (ang. oedema disease), ki se pojavita v istem starostnem obdobju, to je po odstavitvi (Luppi, 2017; Fairbrother in Nadeau, 2019; Byun in sod., 2022). Pri ostalih kategorijah se pri posameznih prašičih pojavljajo z *E. coli* povzročene infekcije sečil (UTI oziroma ang. urinary tract infection), mastitis-metritis-agalakcija sindrom (MMA), septikemija in poliserozitis ter driske pri starejših živalih (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Patogene *E. coli* se od nepatogenih razlikujejo po tem, da imajo adhezijske faktorje za kolonizacijo tankega črevesja in vsaj en eksotoksin. *E. coli* povzroča v obdobju po odstavitvi dve klinični sliki. Prva izmed njiju je poodstavitvena driska, ki jo povzroča patotip ETEC z enterotoksini, pri čemer funkcijo adhezina opravljata običajno fimbrijski adhezini F4 ali F18, v manjši meri pa jo lahko povzroča tudi patotip EPEC brez posebnih virulentnih faktorjev. Poodstavitvena driska, ki se pojavi 2–3 tedne po odstavitvi, povzroča drisko in visok pogin (Luppi, 2017; Fairbrother in Nadeau, 2019). Drugo klinično sliko, edemsko bolezen, povzroča patotip STEC, ki izloča toksin Stx2e. Slednji pri prehajanju v krvni obtok živali poškoduje stene krvnih žil, zato nastane makroskopsko viden edem različnih lokacij telesa, klinične živčne znake pa povzroča edem možganov (Fairbrother in Nadeau, 2019; Berger in sod., 2023).

Okužbe s patogenimi sevi *E. coli* v reji prašičev povzročajo velike ekonomske izgube zaradi visoke obolevnosti in smrtnosti. Bolni prašiči bistveno slabše priraščajo zaradi driske ali centralnih motenj, ki jih povzroča edemska bolezen, v nekaterih primerih pa je vzrok kombinacija obeh oblik edemske bolezni. K visokim stroškom pripomore tudi nakup vakcin in prehranskih dodatkov (Verdonck in sod., 2003; Fairbrother in Nadeau, 2019; Nguyen in sod., 2016; Byun in sod., 2022).

Bakterije iz patotipa STEC kot del normalne mikroflore prašičjih prebavil nimajo fimbrij, medtem ko ima lahko patotip EDEC kot podskupina STEC, ki povzroča edemsko bolezen, poleg STx2e oziroma VT2e toksina tudi fimbrije podtipa F18ab ali F18ac. Črevesje prašičev

kolonizira patotip EDEC s fimbrijskim adhezinom F18, ki se veže na komplementarne sluznične receptorje tankega črevesja od sredine jejunuma do ileuma (Fairbrother in Nadeau, 2019). Slednji še niso povsem identificirani in raziskani za razliko od receptorjev za fimbrijske adhezine 4. Znano je le, da so F18 receptorji pomembni za nastanek edemske bolezni in da je dovzetnost kolonizacije prebavil s patotipom F18 EDEC uravnana z dominantnim alelom ter zavirna z recesivnim alelom (Frydendahl in sod., 2003). Ta alela se nahajata na lokusu na kromosomu 6 v bližini lokusa za dovzetnost prašičev za stres. Dovzetni prašiči so nosilci dominantnega alela, odporni prašiči pa vsaj enega recesivnega alela. Dovzetnost za bolezen je odvisna tudi od FUT1 gena, ki kodira alfa(1,2)-fokuzil transferazo (Bao in sod., 2011).

## 1.4 EDEMSKA BOLEZEN

### 1.4.1 *E. coli* kot povzročiteljica edemske bolezni

Edemsko bolezen pri prašičih najpogosteje povzroča patotip STEC s fimbrijskim adhezinom F18 (ECL, 2004), ki obstaja v podtipih F18ab (86 % podtipov) in F18ac, ali s fimbrijskim adhezinom AIDA, ki izloča toksine shiga toksin 2e (Stx2e) ter verotoksin 2e (VT2e), EAST1 (enteroagregacijski toplotno stabilni enterotoksin 1) in alfa-hemolizin. Spada v O seroskupine O138, O139, O141 in O147 (Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019; Byun in sod., 2022; Berger in sod., 2023).

Diagnostiko in zdravljenje otežujejo mešane okužbe z različnimi patotipi *E. coli*. Okužba s patotipom ETEC s fimbrijskim adhezinom F4 povzroča enterično kolibacilozo in šok pujskov pred ali po odstavitvi. Zabeležene so hkratne okužbe s F18 STEC in F4 ETEC, kjer so zaznavni klinični znaki ter posmrtna najdba, povezane tako s poodstavitveno drisko kot z edemsko boleznijo, in hkratne okužbe s F18 ETEC in F4 ETEC (Prager in sod., 2004; Fairbrother in Nadeau, 2019).

Virulentni geni *E. coli* se lahko nahajajo na plazmidih, v bakteriofagih, transpozonih (odseki molekule DNA, ki se premikajo z enega mesta v genomu na drugo mesto znotraj istega kromosoma ali med različnimi kromosomi) in otočkih patogenosti (ang. PAIs ali pathogenicity islands), in se lahko prenesejo na nove seve bakterij. To vodi v nastanek novih kombinacij virulentnih faktorjev (Kaper in sod., 2004), zato lahko klinične znake edemske bolezni povzroči tudi okužba z enterotoksičnimi patotipi *E. coli* (ETEC), ki izločajo verotoksin, ali pa slednjega v kombinaciji z drugimi enterotoksini izločajo drugi sevi *E. coli* (Taylor, 2013). Na plazmidih

so lahko geni za enterotoksine, fimbrije in pile. Bakteriofagi so prenašalci gena za Stx toksin, na otočkih patogenosti so zapisi za AE lezije (lezije, ki nastanejo zaradi pritrjanja *E. coli* na sluznico črevesja, ki mu sledi uničenje ščetkastega obroba in izpostavitve apikalne membrane); pri patotipu ExPEC se zapisi za hemolizin, citotoksine in fimbrije nahajajo na kromosomih. Plazmidni prenos je *in vivo* prisoten izjemno redko (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Zaradi prenosa virulentnih faktorjev med bakterijskimi sevi znotraj vrste lahko verotoksične linije *E. coli* hkrati z verotoksinom izločajo tudi enterotoksin, ki pri prizadetih živalih povzroča drisko in kataralni enteritis. Problematični serotipi so O139:K12:H1, O138:K81:NW, O141:K85ab H4 in O141 K85a, cH4 (Taylor, 2013).

#### **1.4.2 Epidemiologija edemske bolezni**

Edemska bolezen se v rejah prašičev pojavi v starosti 4–8 tednov (Taylor, 2013) oziroma v starosti od 4–12 tednov (Yoshimura in sod., 2023) oziroma v povprečju deset dni po odstavitvi sesnih pujskov, v nekaterih primerih pa lahko tudi kasneje (Fairbrother in Nadeau, 2019). Edemska bolezen in poodstavitvena driska se pojavljata v istem starostnem obdobju. Tekači se večinoma okužijo peroralno (Fairbrother in Nadeau, 2019; Byun in sod., 2022). Eden izmed razlogov za razmnoževanje patogenih sevov *E. coli* je upad maternalnih protiteles (Fairbrother in Nadeau, 2019), drugi pa neustrezna sestava krme za tekače, ki vsebuje preveč ogljikovih hidratov in beljakovin. Takšen obrok je energetsko zelo bogat in povzroči neravnovesje v fiziološki črevesni mikroflori, kar vodi v razmnožitev patogenih sevov bakterij, med njimi tudi *E. coli*.

Prizadeti so posamezni prašiči v boksu ali celotna skupina z incidenco od 10 do 30 % v posamičnih rejah po celem svetu (Taylor, 2013). Bolezen se običajno pojavlja sporadično ali v manjših izbruhih v specifičnih starostnih skupinah prašičev. Pogin je med 50 in 90 % (Casanova in sod., 2018; Fairbrother in Nadeau, 2019), ponekod pa lahko doseže tudi 100 % populacije tekačev. Poleg tekačev in pitancev lahko izredno redko zbolijo tudi svinje; pogosteje pri krmljenju krme z visoko vsebnostjo beljakovin in brez prehranskih dodatkov (Taylor, 2013), kot so oves kot vir prehranske vlaknine, organski ali anorganski zakisljevalci vode ali krme, cinkov oksid in plazemske beljakovine (Neumann in sod., 2020). Dejavniki, ki poleg prisotnosti enteričnih receptorjev za fimbrijske adhezine, odsotnosti maternalnih protiteles v kolostrumu in mleku, tipa obroka ter pogostosti hranjenja vpliva na povzročitelje edemske bolezni, je tudi

prisotnost morebitnih drugih črevesnih patogenov, kot so na primer Rotavirusi (Neumann in sod., 2020).

### 1.4.3 Načini okužbe in patogeneza edemske bolezni

Možen je prenos patogenih sevov *E. coli* neposredno s prašiča na prašiča z aerosolom ali posredno preko kontaminiranega življenjskega okolja, kontaminirane vode in krme, prevoza ali preko drugih živalskih vrst. Pomemben vir fekalno-oralne infekcije so kontaminirani odstavitveni boksi ali prasilišča. Peroralno zaužite bakterije *E. coli* kolonizirajo črevo in se razmnožijo do  $10^9$  CFU/g. Za nalezljive patotipe veljajo ETEC, EDEC in EPEC.

Po peroralni okužbi se bakterije serotipov O138, O139, O141 in O147 v treh do šestih dneh pritrdijo na vrhove in strani resic distalnega jejunuma ter ileuma, ki jih kolonizirajo (Fairbrother in Nadeau, 2019). S fimbrijskima adhezinoma F18ab in F18ac se pritrdijo na F18 receptorje ščetkastega obrobka iz diferenciranih epitelijskih celic in se namnožijo (Coddens in sod., 2009; Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019). Slednji so pod vplivom individualno variabilne genetske regulacije, zato so nekateri prašiči na bolezen odporni (Coddens in sod., 2009; Taylor, 2013). Na črevesnih resicah v srednjem delu jejunuma obolelih prašičev je okoli štiri milijarde patogenih *E. coli*; največ teh bakterij kolonizira tanko črevo dva dni po peroralni okužbi in pred pojavom kliničnih znakov edemske bolezni (Taylor, 2013).

Kolonizacija črevesja s patotipom F18 STEC doseže vrh 3–5 dni po okužbi in poteka počasneje kot pri okužbi s F4 ETEC, kjer je vrh že 2 dni po okužbi. Toksin Stx2e se absorbira v sistemsko cirkulacijo in povzroči poškodbe endotelija krvnih žil ter celic tarčnih organov. Vezava toksina na Gb4 (glikolipidni površinski receptor na eritrocitih, ki služi kot vezavno mesto za verotoksin ob toksemiji) eritrocitov povzroči podaljšano izpostavljenost toksinu. Slednjega dokažemo z imunološkimi metodami v vzorcu endotelija malih žil prebavil in membrane resic enterocitov in bazicitov. V normalnih pogojih absorpcija toksina iz črevesnega lumna ne poteka, saj poleg same prisotnosti toksina patogenezo omogoči predvsem stopnja črevesne prepustnosti. Selektivnost celične prepustnosti v črevesju je v primeru edemske bolezni, še posebej pa multifaktorielnih gastrointestinalnih obolenj, prizadeta zaradi pretirane namnožitve patogenih sevov bakterij, ki izločajo različne toksine. V krvni obtok se zato absorbira veliko toksina, ki se ne nahaja neposredno v krvni plazmi, temveč se veže na Gb4 eritrocitov ter se raznese do ostalih občutljivih tkiv. Drugi dejavnik, ki vpliva na količino absorbiranega toksina, je

individualna predispozicija prašiča (Matise in sod., 2003). Nekateri sevi patotipa EDEC prehajajo skozi prebavila v mezenterialne bezgavke in tam izločajo toksin Stx2e, ki se na tej lokaciji tudi absorbira (Fairbrother in Nadeau, 2019). Blago povečana prepustnost stene krvnih žil zaradi degenerativne angiopatije malih arterij in arteriol omogoča nastanek transudata z nizko vsebnostjo beljakovin, kar vodi v nastanek makroskopsko vidnih edemov (Fairbrother in Nadeau, 2019; Berger in sod., 2023).

Nastali verotoksin se med toksemijo absorbira v različne celice in tkiva, vključno z gladkimi mišičnimi celicami *tunice medie* arteriol, in razgrajuje ribosomalno RNA ter tako inhibira sintezo beljakovin. To povzroči angiopatijo submukoze krvnih žil in povišan krvni tlak (Kaper in sod., 2004; Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019). Prve lezije so zaznavne dva dni po okužbi in vključujejo otekanje in vakuolizacijo endotelija krvnih žil, subendotelialno odlaganje fibrina, perivaskularni edem, nastanek mikrotrombov, odmiranje *tunice medie*, proliferacijo endotelija, lahko pa tudi poškodbe submukoznega živčnega pleteža. Posledice perivaskularnih lezij v centralnem živčnem sistemu so makroskopsko vidne kot obrazni edem in centralne motnje (Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019). Klinična znamenja sistemske absorpcije toksina Stx2e iz črevesja pri okužbi s patotipom EDEC so enaka kot pri eksperimentalni intravenozni aplikaciji čistega toksina (Fairbrother in Nadeau, 2019) v koncentraciji 3ng na kilogram telesne mase živali, dvakrat večji odmerek pa je letalni odmerek za prašiče (Taylor, 2013).

Pri mešanih okužbah z ETEC tvorijo bakterije ob stiku s črevesno sluznico enterotoksine, ki spremenijo razmerje med vodo in elektroliti v tankem črevesju. To pospeši črevesno sekrecijo in vodi v dehidracijo, metabolno acidozo in pogin. Enterotoksini, ki jih izločajo sevi iz patotipa ETEC, so ST a/b, LT in EAST-1, ki se pojavijo tudi pri edemski bolezni, povzročeni z bakterijo z F18:Stx2e (Fairbrother in Nadeau, 2019; Byun in sod., 2022).

Fatalni šok je oblika okužbe z *E. coli*, ki jo povzročajo F4 ETEC ali Stx2e toksin-proizvajajoči sevi, ki so povezani z edemsko boleznijo. Potek bolezni je tako hiter, da prašiči poginejo zaradi šoka še pred pojavom driske ali cerebralnega edema. Zaradi sprostitve velike količine LPS kolonizirajočih ETEC, ki vsebujejo lipid A, se ob množični agregaciji in degranulaciji nevtrofilnih granulocitov sintetizira ter sprosti velika količina mediatorjev vnetja. Najpomembnejši za nastanek kliničnega obolenja so TNF- $\alpha$ , IL-1 in IL-6. Produkti vnetja

poškodujejo žilni endotelij in povzročijo izgubo tekočine, hipovolemični šok in modulacijo koagulacije, odlaganje fibrina ter nastanek krvnih strdkov (Fairbrother in Nadeau, 2019).

#### **1.4.4 Klinična znamenja edemske bolezni**

Edemska bolezen se v reji večinoma pojavi v prvih tednih po odstavitvi, in sicer sporadično ali v perakutnih izbruhih z nenadnim poginom brez opaznih kliničnih znamenj (Fairbrother in Nadeau, 2019; Berger in sod., 2023).

Klinično najbolj značilen je akuten potek bolezni. V začetni fazi je zaradi edema glasilk prisoten značilen cvileč glas; rektalna telesna temperatura je sprva povišana do 40 °C, nato pa se zniža na fiziološke meje. Rejci najprej opazijo nenaden pogin med tekači, ki so v najboljši kondiciji, preživele obolele živali pa v rasti zaostajajo za vrstniki in kažejo značilna klinična znamenja obraznega edema, zlasti vek in čela, ter različno stopnjo prizadetosti centralnega živčnega sistema, lahko se pojavita tudi driska ali zaprtje. Lezije centralnega živčnega sistema se navzven kažejo z otopelostjo, slepoto in tiščanjem glave v stene, kasneje, še posebej ob hranjenju, moteno koordinacijo gibanja in izgubo ravnotežja.

Kasneje se pojavita pareza in paraliza. Prašiči obležijo v bočnem položaju in veslajo z nogami, čemur sledita koma in pogin v 4–36 urah po pojavu prvih kliničnih znamenj bolezni. Prašiči lahko popolnoma okrevajo ali ostanejo paralizirani. Slednje je treba ob močno prizadeti zmožnosti hoje evtanazirati. (Cornick in sod., 2000; Taylor, 2013; Berger in sod., 2023). Klinični znaki v čredi so prisotni 4–14 dni, sledi okrevanje ali pogin; pogosta je rekurenca.

Pri blagi obliki bolezni se pojavita podkožni edem in srbež. Slednji izzveni v primeru, da prašič okreva. Pri posamičnih prašičih v terminalni fazi se lahko pojavijo tudi dispneja, smrčanju podobni zvoki ob dihanju, in vodena driska s strdki sveže krvi (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Pri subkliničnem poteku bolezni lahko najdemo lezije krvnih žil, ki eksperimentalno povzročajo zavrtost rast (Fairbrother in Nadeau, 2019; Leneveu in sod., 2019; Berger in sod., 2023) pri odstavljenih prašičih s telesno maso 8–30 kg (Leneveu in sod., 2019; Berger in sod., 2023).

Kronična oblika se pojavi pri manjšem številu prašičev, ki okrevajo po akutni edemski bolezni ali poodstavitveni driski, ki so jo povzročili sevi, ki izločajo tudi Stx2e. Pojavi se stanje, ki je bilo pred ugotovitvijo povezave z edemsko boleznijo imenovano cerebrospinalna angiopatija,

in se kaže z različnimi živčnimi znaki, kot so kroženje, trzanje z glavo in atrofija mišic okončin s progresivno šibkostjo. Redko je viden tudi subkutani edem.

Obstaja tudi atipična oblika edemske bolezni, kjer se pojavlja terminalna krvava driska (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Ena izmed najnevarnejših oblik okužbe z *E. coli* je fatalni šok. Poleg F4 ETEC jo povzročajo tudi z edemsko boleznijo povezani sevi *E. coli*, ki izločajo toksin Stx2e. Gre za enterično kolibacilozo, ki ji sledi šok; pojavi se pri mladih pujskih pred ali po odstavitvi. Infekcija poteka tako hitro, da prašiči poginejo še pred pojavom možganskega edema (Fairbrother in Nadeau, 2019).

#### **1.4.5 Patoanatomske, patohistološke in patocitološke lezije**

Na patoloških sekcijah so poginjeni prašiči običajno v dobri kondiciji in imajo poln želodec sveže suhe krme (Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019). Redko je opazna cianoza kože (Taylor, 2013). Pri nenadnem poginu vidimo edem vek in obraza ter patognomoničen znak edemske bolezni, in sicer edem velike krivine želodca med sluznico in mišično plastjo oziroma želatinozni submukozni edem kardije želodca ali fundusa, ki je lahko komaj opazen ali pa dosega debelino do 2 cm (Fairbrother in Nadeau, 2019; Miller in Porter, 2021). Pogoste najdbe so tudi želatinozni edem kolonovega oporka (Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019; Miller in Porter, 2021), včasih tudi mezenterija tankega črevesja in žolčnika (Fairbrother in Nadeau, 2019; Miller in Porter, 2021), grla ter kapsule ledvic (Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019; Miller in Porter, 2021). Vidna je tudi bistra serozna tekočina z malo fibrina v perikardu, plevralni in peritonealni votlini ter ishemija ledvične skorje in kongestija sredice ledvic (Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019), pa tudi edematozne ter polnokrvne bezgavke kolona in mezenterija (Kanengoni in sod., 2017; Fairbrother in Nadeau, 2019). Ob prisotnosti enteritisa lahko edem po poginu prašičev izgine in na sekciji ni viden (Taylor, 2013).

Tanko črevo je prazno, kolon pa je lahko blago napolnjen ali obstipiran. Vidne so različne stopnje pljučnega edema. Značilna je nepopolna sublobarna kongestija pljuč, možne so posamične epikardialne ali endokardialne petehije, ki so podobne petehijam pri bolezni murvastega srca, a pri slednji za razliko od edemske bolezni segajo v miokard. Nekateri prašiči razvijejo hemoragični gastroenteritis. V tem primeru so vidni edem kardije, sluznice spodnjega dela tankega črevesja in zgornjega dela debelega črevesja, kjer so tudi obsežne krvavitve. Pred

poginom je pri takih prašičih opazna vodena driska s krvnimi strdki (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Pri atipični obliki edemske bolezni najdemo hemoragične lezije kardialne regije želodca, ileuma in debelega črevesja. Akutni hemoragični gastroenteritis se pojavi tudi ob eksperimentalni aplikaciji visoke doze toksina Stx2e. Primarno se pojavi nekroza malih arterij in arteriol, ki vodi v luminalno krvavitev, sekundarno pa epiteliialna nekroza (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Pri fatalnem šoku so makroskopsko vidni minimalni klinični znaki, kot je cianoza ekstremitet, lahko pa tudi rumenkasta ali rjavkasta driska (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Na patohistoloških rezinah tkiva je viden edem stene želodca in možganov, kjer so poudarjeni perivaskularni prostori. Ob kroničnem obolenju patologi najdejo encefalomalacijo, hialino degeneracijo in fibrinoidno nekrozo arterij in arteriol, lahko tudi proliferativno angiopatijo, če pogin ni bil takojšen. Spremembe so lahko zaznavne tudi pri subklinično bolnih živalih (Taylor, 2013). Mikroskopsko zaznavne lezije v zgodnjem poteku edemske bolezni obsegajo neenakomerne plasti bakterij, pritrjenih na sluznico distalnega dela jejunuma in ileuma. Glavna znaka bolezni sta degenerativna angiopatija malih arterij in arteriol ter edem okoliških tkiv. Pogosto so vidne spremembe arterij mezokolona ob bezgavkah mezokolona (Fairbrother in Nadeau, 2019). Spremembe krvnih žil so boljše vidne pri subkliničnem poteku bolezni in pri prebolevnikih akutnega poteka, kjer so lahko spremenjeni le segmenti krvnih žil (Matise in sod., 2000; Fairbrother in Nadeau, 2019).

Pri citopatološki preiskavi je prisotna nekroza gladkomišičnih celic *tunice medie* krvnih žil, na kar nakazujejo piknotičen in kariorektni jedrni debris (Matise in sod., 2000) ter hialine spremembe citoplazme ter fibrinoidni depoziti v nekaterih spremembah žilne stene. Pri akutnem poteku edemske bolezni po eksperimentalni okužbi se je pojavil edem mehkih možganskih ovojnic in perivaskularnih prostorov možganov (Fairbrother in Nadeau, 2019; Miller in Porter, 2021) ter nekroza endotelijskih celic v možganih (Casanova in sod., 2018). Spremembe sten krvnih žil možganov so lahko obkrožene z eozinofilnimi PAS + kapljicami, starejše lezije pa nakazujejo na proliferacijo *tunice adventitie* in *tunice medie* krvnih žil. Opaznih tromboz običajno ni (Fairbrother in Nadeau, 2019). Ob hemoragičnem gastroenteritisu so prisotne spremembe krvnih žil, ki so podobne človeškemu hemoragičnemu kolitisu ob

okužbi z EHEC, in sicer oteklina, vakuolizacija in proliferacija endotelnih celic, subendotelialno odlaganje fibrina, nekroza tunike medije, perivaskularni edem in mikrotrombi. Prebolevniki edemske bolezni imajo multifokalno encefalomalacijo na območju možganskega debla in ob spremembah krvnih žil, ki je najverjetneje posledica ishemije. Kot pri ostalih obolelih prašičih so tudi tu prisotne tipične lezije malih arterij in arteriol (Fairbrother in Nadeau, 2019; Miller in Porter, 2021).

Na patoanatomski sekciji prašičev s fatalnim šokom je opazna omejena kongestija tankega črevesja in stene želodca ter s krvjo pomešana vsebina prebavil. Mikroskopsko je zaznavna kongestija sluznice želodca in tankega črevesja zaradi mikrovaskularnih fibrinskih trombov. Na preparatih črevesja sta v težkih primerih edemske bolezni opazni nekroza črevesnih resic z omejeno infiltracijo nevtrofilnih granulocitov in občasno krvavitve *laminae propriae* jejunuma in ileuma (Fairbrother in Nadeau, 2019).

#### **1.4.6 Prirojena in pridobljena imunost**

Prašiči lahko aktivno humoralno imunost proti edemski bolezni pridobijo z naravno okužbo ali s cepivi, ki vsebujejo površinske antigene verotoksične *E. coli* ali njihove dele. Pasivno humoralno imunost pridobijo pujski s kolostrumom mater ali z zaužitjem ali parenteralno aplikacijo protiteles iz hiperimunega seruma ali krvne plazme prašičev, ki so bolezen že preboleli (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Okuženi in oboleli tekači pridobijo lokalna sluznična sekretorna protitelesa imunoglobulinov razreda M proti F18 in F4 *E. coli*. Kasneje se pojavijo tudi protitelesa imunoglobulinov razreda A. Po podatkih iz različnih raziskav obstaja različna stopnja navzkrižne zaščite med protitelesi proti fimbrijskem adhezinu F18ab in F18ac. Prašiči, ki preživijo naravno okužbo, imajo v manjši meri tudi zaščitna protitelesa proti podenoti B toksina Stx2e, ki so zaznavna z ELISA testom (Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019). Eksperimentalna aplikacija toksoida Stx2e je prašiče učinkovito zaščitila pred pojavom edemske bolezni ob eksperimentalni okužbi (Fairbrother in Nadeau, 2019).

#### **1.4.7 Diagnostika edemske bolezni**

Sum edemske bolezni se postavi na podlagi anamneze, kliničnih znamenj in patoloških ter patohistoloških preiskav poginjenih prašičev. Nenaden pogin odstavljenecv in povišana temperatura, subkutani edem vek in območja nad frontalnimi kostmi, klinična znamenja motenj centralnega živčnega sistema, kot sta delna ataksija in zanašanje pri hoji, ter nekrvava driska preživelih obolelih prašičev so anamnestični podatki, ki napeljejo na sum edemske bolezni, prav tako velika vsebnost beljakovin in ogljikovih hidratov v obroku, krmljenje *ad libitum* in slaba tehnologija reje ter nezadostni biovarnostni ukrepi, kar omogoča vnos in obstanek verotoksične *E. coli* v reji. Če se je huda driska pojavila pred ostalimi kliničnimi znaki, je edem pogosto odsoten (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Do končne diagnoze edemske bolezni vodijo tipične lezije, opisane v prejšnjih poglavjih, pozitivna bakterijska kultura na mikrobiološkem gojišču, dokaz vzročne *E. coli* in potrditev določenega faktorja virulence. Danes se virotipizacija bakterij uporablja pogosteje kot serotipizacija (Frydendahl in sod., 2001; Fairbrother in Nadeau, 2019; Barth in sod., 2021).

Za vzorčenje edemske bolezni se pri živih prašičih najpogosteje uporablja feces odstavljenecv, ki naj bi imel najvišjo vsebnost patogenih *E. coli* sevov (Barth in sod., 2021; Berger in sod., 2023). Vzorci se lahko tudi rektalni bris ali pa se uporabi skupinski vzorec fecesa v boksih pri vzorčenju z obujki ali ustno tekočino obolelih prašičev, pridobljeno z ožemanjem bombažnih vrvi, ki so bile obešene v boksih. Vsi naštetih postopki sodijo med neinvazivne načine vzorčenja in se nadaljnje uporabijo za nasaditev na bakteriološka gojišča ter molekularne preiskave. Preiskava je smiselna v primeru, da prašiči v času odvzema vzorcev niso prejeli antibiotikov. Najuporabnejši so vzorci, odvzeti akutno bolnim prašičem z najbolj izraženimi kliničnimi znamenji bolezni, in sicer v prvih dneh po okužbi.

Pri poginjenih prašičih se vzorci bris črevesne sluznice distalnega jejunuma, ileuma ali kolona. Vzorce je treba pri poginjenih ali evtanaziranih prašičih vzeti čimprej, sicer gojišče prerastejo ostale bakterije iz črevesne mikroflore. Vzorci naj bodo pred preiskavo skladiščeni v sterilnih ohlajenih posodah s temperaturo 4–6 °C ali zamrznjeni, optimalen čas transporta do laboratorija je 3 ure. V kolikor je predviden transport daljši od 24 ur, je priporočljiva uporaba transportnega gojišča po Stuartu (Barth in sod., 2021).

Bakterijska kultura tankega črevesja se uporablja za diagnostiko okužbe s patotipom ETEC, ki je glavni povzročitelj edemske bolezni pri divjih prašičih (Petit in sod., 2020), kulturi tankega

črevesja in kolona pa za diagnostiko edemske bolezni pri domačih prašičih in okužbe s patotipom EPEC, kjer po inkubaciji zraste običajno (skoraj) čista kultura hemolitične *E. coli* v primeru edemske bolezni ali nehemolitične *E. coli* v primeru rasti EPEC kulture. Prisotnost hemolize izključuje okužbo z EPEC in nekaterimi F4-EPEC ter vodi v postavitve suma na diagnozo edemske bolezni in poodstavitvene driske (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Ker večina izolatov iz patotipa EDEC izloča  $\alpha$ -hemolizin, se za izolacijo povzročitelja edemske bolezni najpogosteje uporablja krvni agar z ovčjo krvjo, kombiniran s selektivnimi gojišči, kot so sorbitol MacConkey agar, agar po Drigalskem, Gassner ali Hektoen agar. *E. coli* iz skupine serotipa O157:H7 niso bile sposobne fermentirati sorbitola, zato je bil sorbitol MacConkey agar učinkovit za razlikovanje sumljivih kolonij od nesumljivih. Danes se v klinični praksi pojavljajo tudi posamezni sevi iz tega serotipa, ki so sposobni fermentirati sorbitol (imenovani sevi SF-O157), zato ta biokemijski test izgublja pomen (Barth in sod., 2021).

Težave pri interpretaciji rezultatov se pojavijo ob dokazovanju subklinične edemske bolezni, kjer gre za mešano infekcijo s hemolitičnimi in nehemolitičnimi patotipi ETEC, in pri mešanih infekcijah edemske bolezni v kombinaciji z drisko, ki so danes vse pogostejše. Pri starejših prašičih s subkliničnim ali kroničnim potekom edemske bolezni je bakterijska kultura manj pomembna, ker patotip EDEC ob pojavu kliničnih znakov ni več dominanten sev v prebavnem sistemu in je lahko število bakterij iz tega patotipa na gojišču manjše. Negativen bakteriološki test na patotip EDEC zato ne izključuje edemske bolezni. Diagnozo se postavi na podlagi znakov kronične angiopatije in fokalne encefalomalacije, kar v večini primerov pomeni potrebo po večjem številu *post mortem* preiskav prašičev in njihovih patohistoloških preparatov. Včasih prašiči poginejo zaradi kapi ob rupturi močno spremenjenih arteriol. Predilekcijsko mesto za slednje je v bazalnih ganglijih na *corpus striatum* (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Tkivne rezine se impregnira s parafinom in fiksira v formalinu, nato pa pregleda na vidno kolonizacijo z bakterijami, lahko tudi po dodatnem imunohistokemičnem barvanju rezin. Lahko se uporabi zamrznjenice za indirektno imunofluorescenco. Odsotnost bakterijske kolonizacije ne izključuje okužbe prašičev s patotipoma ETEC in EDEC (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Izolacija serotipov O139:K81, O139:K12 in O141:K58 iz tankega črevesja je dokaz prisotnosti *E. coli*, a je za potrditev edemske bolezni nujna še identifikacija genov za VT2e in F18. VT2e se dokaže v supernatantu kulture, v kolonijah z DNA lovkami ali s PCR sekvenciranjem. V

uporabi je tudi ELISA za detekcijo VT2e v fecesu in rekombinantni VT2e za dokaz protiteles v serumu prašičev 2–3 mesece po okužbi (Taylor, 2013).

Preiskava v mikrobiološkem laboratoriju je dopolnjena z molekularnimi metodami detekcije, ki vključujejo izolacijo DNA in duplex PCR test (PCR metoda za hkratno pomnoževanje dveh različnih odsekov genskega zapisa). Slednji je specifičen, hiter in praktičen za izvedbo, saj določi vsebnost specifičnih genov za fimbrijski adhezin F18 in verocitotoksin Stx2e, kar v primerjavi s klasičnim PCR, kjer se hkrati testira le na en gen virulence, močno poveča senzitivnost in specifičnost diagnostike ter skrajša čas testiranja pri delu z velikim številom vzorcev (Barth in sod., 2021; Berger in sod., 2023). Prednost molekularnih metod pred bakteriološkimi testi je tudi manjše biovarnostno tveganje, saj je delo z izolati STEC v večini evropskih držav klasificirano kot biovarnostni razred 3. Nekateri sevi so potencialno biološko orožje, zato morajo biti laboratoriji, ki z njimi delajo, dobro zavarovani (Barth in sod., 2021).

Ena izmed novejših metod je fluorescenčna PCR metoda s 5' nukleazno aktivnostjo Taq polimeraze, ki se uporablja za diagnostiko genov za različne faktorje virulence v genomu *E. coli*, izolirane iz vzorcev prašičev. Možne tarče so faktorji kolonizacije, kot so gen za fimbrijski antigeni F4, F5, F6, F18, F41 ali gen za intimin ali geni za toksine, ki jih bakterija izloča, in sicer termostabilni toksini Sta, STb in EAST1, termolabilni toksin LT in verotoksin VT2e. Rezultati takšnega PCR testa se interpretirajo na podlagi primerjave z referenčnimi sevi *E. coli*, ki so bili predhodno pregledani s fenotipizacijo in DNA hibridizacijo, ter na podlagi primerjave s sevi *E. coli* s terena, ki so bili predhodno karakterizirani. V primerjavi s klasično PCR metodo je metoda s 5' nukleazno aktivnostjo polimeraze hitrejša in bolj specifična, zato je primerna za detekcijo virulentnih genov *E. coli* v veterinarski laboratorijski diagnostiki. Pri klasični PCR metodi ob izvajanju dodatnih preiskav, kot sta blotting in restriction fragment analysis, je velika nevarnost kontaminacije s PCR produktom (Frydendahl in sod., 2001).

DNA polimeraza s 5' nukleazno aktivnostjo razgradi fluorescenčno probo, ki je specifična za iskani gen. Proba ima na 5' koncu reporter dye in na 3' koncu quencher dye. Ko je proba intaktna, fluorescenčno barvilo na 3' koncu absorbira signal, ki ga oddaja fluorescenčno barvilo na 5' koncu. Ko se probi približa DNA polimeraza med procesom elongacije pomnoževane DNA verige, s svojo 5' nukleazno aktivnostjo razgradi probo in fluorescenčno barvilo na 3' koncu ne absorbira več signala s 5' konca, zato je signal možno zaznati in zabeležiti kot

pozitiven PCR rezultat v realnem času. Količina PCR produktov je premo sorazmerna z jakostjo signala, ki ga oddaja barvilo na 5' koncu probe (Frydendahl in sod., 2001).

Za razlikovanje izolatov *E. coli*, ki povzročajo edemsko bolezen, od izolatov, ki povzročajo kolibacilozo, se uporabljata metodi PCR in southern blot. Z njima se določi, ali je prisoten celoten otoček patogenosti ETT2 (*E. coli* type three secretion system 2), kar nakazuje na izolat, ki povzroča edemsko bolezen, ali prisotnost zgolj z delecijo nastalega podtipa ETT2, ki je bil dokazan pri izolatih, povezanih s kolibacilozo in ne z edemsko boleznijo (Prager in sod., 2004).

#### **1.4.8 Diferencialne diagnoze**

Ob nenadnem poginu tekačev nekaj tednov po odstavitvi moramo vedno posumiti na edemsko bolezen; poleg slednje pa diferencialno diagnostično pridejo v poštev bolezen murvastega srca, srčni zastoj, klasična prašičja kuga in antraks, ki prav tako povzročijo nenaden pogin prašičev v dobri kondiciji. Ob povišani telesni temperaturi in obraznem edemu ter kliničnih motnjah centralnega živčnega sistema je treba izključiti ostale patološke procese v centralnem živčnem sistemu. To so Tješinsko-Talfanska bolezen, meningitis pri okužbi s *Streptococcus suis*, *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* ali *Glaesserella parasuis*, bolezen Aujeszkega, zastrupitev s kuhinjsko soljo, selenom ali svincem, organoarzenske zastrupitve in huda dehidracija (Barth in sod., 2021; Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019).

Diferencialne diagnoze pri vseh nekrvavih driskah so rotavirusne okužbe, salmoneloza, TGE (ang. transmissible gastroenteritis), PED (ang. porcine epidemic diarrhea), pri starejših tekačih in pri pitancih pa proliferativna enteropatija, ki jo povzroča znotrajcelična bakterija *Lawsonia intracellularis* (Fairbrother in Nadeau, 2019).

#### **1.4.9 Zdravljenje edemske bolezni**

Zdravljenje edemske bolezni je redko uspešno, ko se že pojavijo klinična znamenja, saj se je takrat toksin Stx2e že absorbiral in vezal na receptorje (Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019). Za zdravljenje edemske bolezni se uporabljajo antibiotiki, ki se aplicirajo bodisi parenteralno ali peroralno v vodo za pitje. Slednji morajo v lumnu prebavil doseči terapevtsko koncentracijo, to je zadostno koncentracijo antibiotika za protimikroben učinek proti bakterijam, da je terapija uspešna. Običajno so antibiotiki izbora tetraciklin, streptomycin in ampicilin (Taylor, 2013) ali amoksicilin s klavulansko kislino, ciklosporini, apramicin,

neomicin, ceftiofur in trimetoprim oziroma kot zadnja možnost tudi 3. in 4. generacija cefalosporinov in fluorokinoloni (Fairbrother in Nadeau, 2019). Glede na hiter razvoj rezistence *E. coli* na antibiotike se za uspešno terapijo in preprečitev nadaljnjega razvoja rezistence priporoča izbor antibiotika na podlagi antibiograma. Močno prizadeti prašiči običajno ne jedo in pijejo ali pijejo zelo malo, zato se elektroliti in antibiotična terapija aplicirajo parenteralno. Kasneje se lahko metafilaktično uporabi peroralna terapija (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Antibiotična profilaksa je v nekaterih državah še vedno prisotna kljub neodobravanju potrošnikov, selekciji vse odpornejših bakterij in slabši imunosti živali. Rezistenca bakterij se pojavi v nekaj dneh do nekaj tednih po uporabi antibiotikov. Med najbolj rezistentne bakterijske izolate prašičjih *E. coli* patotipov spadata ravno povzročitelja poodstavitvene driske in edemske bolezni. Kot kemoprofilaksa se parenteralno aplicirajo aminoglikozidi ali kolistin. V zadnjih letih se je na kolistin po svetu pojavila visoka rezistenca bakterij, zato se ga poskuša uvrstiti na seznam kritično pomembnih antibiotikov 2. kategorije (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Protimikrobna zdravila so najučinkovitejša v kombinaciji z zmanjšano konzumacijo krme, ki jo rejci nadomestijo z vključevanjem vlaknine v obrok, in uporabo organskih kislin v krmi ali pitni vodi. Na ta način zmanjšajo število bakterij v tankem črevesju in tako ublažijo klinična znamenja (Taylor, 2013).

Postenje prašičev ob pojavu prvih kliničnih primerov bolezni onemogoči pojav novih kliničnih primerov, ker prepreči kolonizacijo prebavil s patogenimi sevi *E. coli* (Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019). Za zniževanje krvnega pritiska se uporablja melperon v odmerku 4–6 mg/kg telesne mase živali (Taylor, 2013). Glukoza, glicin, citronska kislina in monokalijev fosfat v izotonični raztopini se uporabljajo kot tekočinska terapija prašičev. Količina prejete tekočine mora biti enaka izgubljeni količini tekočine in ne sme preseči 25 % telesne mase pacienta (Fairbrother in Nadeau, 2019).

#### **1.4.10 Preventiva edemske bolezni**

Zaradi omejenih možnosti za uspešno terapijo bolezni je bistvena preventiva edemske bolezni.

##### **1.4.10.1 Tehnologija reje**

Pomembna dejavnika preventive sta dobra higiena z ustreznimi biovarnostnimi ukrepi in pokladanje naraščajoče količine lahko prebavljive krme pred odstavitvijo.

Dobre prakse tehnologije reje prašičev vključujejo vse noter-vse ven sistem reje, ustrezno gostoto naselitve v boksih, ustrezno vlago in temperaturo bivalnega okolja ter gibanje zraka v hlevu, čiščenje in razkuževanje boksov pred vsako zamenjavo skupine prašičev, razkuževanje vodovoda s šoknim kloriranjem in odstavljanje prašičev s čim manjšim okoljskim stresom, ki sicer nastane ob mešanju gnezd, prehladnem okolju, transportu ali novih ogradah (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Sestava obroka je poleg čistega bivalnega okolja in prisotnosti povzročitelja najpomembnejši dejavnik pojava edemske bolezni. Nujna je regulacija količine in pogostosti zaužite krme, vsebnosti in sestave beljakovin, aminokislin, vlaknine, pH obroka in specifičnih krmnih dodatkov.

Prehranska preventiva proti pojavljanju poodstavitvene driske in edemske bolezni vključuje restrikcijo hranjenja in dodatek vlaknine v obrok, pogosto v obliki hranjenja vlaknine po volji. Manjša nutritivna vrednost hrane z vnosom 15–20 % vlaknine in manjšo vsebnostjo beljakovin ter prebavljive energije do polovice normalne vrednosti v primerjavi z običajnim obrokom naj bi zmanjšala pojavnost okužb z *E. coli*. Možen je tudi dodatek vlaknine obstoječemu obroku ali uporaba visoko kvalitetne lucerne z restrikcijo dnevnega vnosa krme (Fairbrother in Nadeau, 2019). Krmljenje z večjo vsebnostjo vlaknin v obroku je kljub učinkovitosti pri preventivi edemske bolezni problematično, saj prašiči ob zauživanju več vlaknine počasneje priraščajo, hkrati pa je v črevesju zaradi zmanjšane števila bakterij premalo antigenega substrata za učinkovit specifičen odziv imunskega sistema (Taylor, 2013). Dieta z malo beljakovin in dodatkom aminokislin bi lahko zmanjšala nastanek toksičnih beljakovinskih presnovkov, ki so povezani z nastankom poodstavitvene driske. Živalske beljakovine zaradi večje prebavljivosti in stimulacije apetita ščitijo pred pojavom poodstavitvene driske; uporaba mlečnih beljakovin na primer zniža incidenco poodstavitvene driske in zniža smrtnost (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Nižja smrtnost zaradi enterotoksemije z *E. coli* in večji prirast sta zabeležena pri obrokih z nižjo kislinsko vezalno kapaciteto ali z dodatkom organskih kislin, saj nižji pH pomembno omejuje razvoj bakterij v prebavilih. Smrtnost zaradi edemske bolezni se ob vnosu organskih ali anorganskih kislin s hrano ni zmanjšala, ker je pH v lumnu v bližini črevesne sluznice močno reguliran. Uživanje 2400–3000 ppm cinkovega oksida (ZnO) zmanjša pojavnost driske in smrtnost ter poveča prirast prašičev, na celičnem nivoju pa deluje protimikrobno, inhibira

adhezijo bakterij in spodbuja ter uravnava izražanje genov za citokine. Vseeno pa je možna povezava med uporabo ZnO in rezistenco bakterij na antibiotike (Fairbrother in Nadeau, 2019; Pejsak in sod., 2023). V Evropski uniji je uporaba ZnO od leta 2022 prepovedana, ker prevelik odmerek ali predolga uporaba delujeta toksično in nevarno okolju (Pejsak in sod., 2023).

Potencial za uporabo v preventivi proti edemski bolezni kažejo tudi nekateri drugi pripravki. Nekateri avtorji navajajo, da  $\beta$ -glukani iz celičnih sten kvasovk zmanjšajo dovzetnost odstavljenih prašičev za F4 ETEC infekcijo (Fairbrother in Nadeau, 2019), drugi, da krmljenje tekačev z  $\beta$ -glukani ne doseže učinka ZnO<sub>2</sub> in v primerjavi s kontrolnim obrokom ne kaže opaznih razlik (Conway in sod., 2022). Dovzetnost za infekcijo s F4 ETEC podobno zmanjšajo endogene ali eksogene proteaze, ki zmanjšajo število F4 receptorjev v tkivih prašičev. Bromelain iz stebel ananasa, ki deluje kot proteaza, ob peroralni uporabi zmanjša vezavo F4 ETEC na receptorje. Njegova učinkovitost je odvisna od doze. Protimikrobni peptidi gostiteljevega obrambnega sistema bi lahko v prihodnosti nadomestili uporabo antibiotikov. Minerali gline, esencialna olja in rekombinantno pridobljeni encimi so zaenkrat nezanesljivi in manj učinkoviti kot antibiotiki. Kolicin E1 je bakteriocin, ki ga proizvajajo sevi bakterije *E. coli* proti drugim sevom *E. coli*. Dodan v prehrano mladih prašičev je zvišal prirast in znižal incidenco ter intenzivnost poodstavitvene driske, povzročene s F18 ETEC. Prebiotiki selektivno stimulirajo koristne bakterije v prebavilih; toplotno inaktivirani in posušeni *Enterococcus faecalis* na primer močno zmanjša incidenco klinične edemske bolezni zaradi patotipa STEC. Probiotiki, kot je iz prebavil prašičev izoliran *Lactobacillus sobrius*, so potencialno koristne bakterije, ki močno zmanjšajo število bakterij iz patotipa ETEC in povišajo dnevni prirast odstavljenecv ob okužbi s F4 ETEC. *Lactobacillus plantarum* ob uporabi v zgodnjem življenju pujskov izboljša prirejo in zmanjša pojavnost driske ob okužbi s F4 ETEC, ker imajo takšne živali bolj razvito črevesno bariero in zaščito selektivne črevesne prepustnosti ter morfologijo prebavil. *Pediococcus acidilactici* in *Saccharomyces cerevisiae boulardii* zmanjšata adhezijo F4 ETEC na sluznico ileuma. Vsaj *P. acidilactici* modulira tudi ekspresijo črevesnih vnetnih citokinov, ki se sproščajo ob infekciji s F4 ETEC. Nekatero raziskavo niso zabeležile učinka ob krmljenju *Lactobacillus sp.*, *E. faecium* in *Bacillus cereus* sev *toyoi*. Fermentirana sojina zrna z glivami iz rodov *Rhizopus* in *Baeillus* zmanjšajo ekskrecijo patotipa ETEC in znižajo incidenco, trajanje ter resnost driske pri obolelih odstavljenecv in tekačih (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Preventivna uporaba antibiotikov v krmi in vodi nekaj dni pred predvidenim pojavom edemske bolezni lahko ublaži izid izbruha (Taylor, 2013; Fairbrother in Nadeau, 2019).

Zaenkrat še ni možno selekcionirati odpornih prašičev na komercialni ravni. Povečevanje ekspresije rezistentnih lokusov F18 in F4 za preprečitev dovzetnosti za podstavitveno drisko in edemsko bolezen še vedno predstavlja izziv. Obstaja nevarnost, da bi prašiče hkrati nehote selekcionirali na neželene lastnosti, ki se nahajajo v bližini teh dveh lokusov. V kolikor bi se v populaciji pojavil pomemben delež prašičev, selekcioniranih na odpornost proti *E. coli*, je težko napovedati, ali bi sledil razvoj bakterij z novimi načini adhezije ali z novimi različicami že obstoječih načinov adhezije, ki bi se zato lahko vezale na nove, še neznanе receptorje. Drugi aktualen problem selekcioniranja odpornih prašičev je nedostopnost tehnik za masovno selekcijo. Trenutno je pri nekaterih genetskih in razmnoževalnih podjetjih v uporabi omejeno število genetskih markerjev, ki se že uporabljajo za povečevanje deleža F4 in F18 odpornih prašičev v populaciji.

#### 1.4.10.2 Preventivno cepljenje

Za preprečevanje izbruhov edemske bolezni so v uporabi metode, ki dosežejo pasivno ali aktivno imunost prašičev. Sistemska protitelesa so manj učinkovita pri zaviranju bolezni kot lokalna sluznična protitelesa, ki nastanejo pri naravni okužbi. Parenteralno aplicirana cepiva, ki sprožijo samo nastanek sistemskih protiteles, so zato manj učinkovita kot cepiva, aplicirana peroralno. Sistemskih protiteles ni dovolj za učinkovito zaščito in lahko celo zavrejo lokalni imunski odziv. Parenteralno apliciranje serumskih IgA protiteles lahko poveča količino sekretornih IgA protiteles v prebavilih, a učinkuje le, dokler je prisoten sistemski odziv, ker v prebavilih ni za antigen specifičnih proizvodnih celic protiteles v GALT-u (ang. gut-associated lymphoid tissue) (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Eksperimentalno je bila učinkovita zaščita s serumskimi protitelesi proti toksinu Stx2e. Ta so bila aplicirana sesnim pujskom direktno kot antiserum svinj, ki so bile tretji in peti teden pred pravitvijo parenteralno cepljene s toksinom z dvojno mutacijo beljakovinske podenote A toksina Stx2e, ali pa so jih pujski zaužili s kolostrumom svinj, ki so bile v času brejosti cepljene s toksoidom Stx2e. Sesni pujski takih svinj so pasivno zaščiteni pred edemsko boleznijo do enega meseca po odstavitvi, saj kakovosten kolostrum in krvna plazma vsebujeta visok titer specifičnih protiteles proti toksinu Stx2e (Taylor, 2013; Oanh, 2012). Pujske se lahko krmi tudi s sušeno krvno plazmo svinj, cepljenih s STEC F18. Zgoraj omenjeni načini pasivne

imunizacije zmanjšajo bakterijsko kolonizacijo črevesne sluznice in toksemijo, povzročeno s toksinom Stx2e (Oanh, 2012; Piñeyro 2016).

Pri tehnologiji reje zgodaj odstavljenih pujskov (odstavljeni v 10. dnevu starosti) bi se za večji prirast in manj drisk lahko uporabljala dieta na osnovi sušene prašičje plazme, ki vsebuje specifična anti-ETEC protitelesa. Znano je, da ima takšna dieta tudi zaviralen učinek na enterotoksemijo zaradi *E. coli*, a samo neposredno znotraj obdobja zauživanja plazme. Plazma se v Severni Ameriki in evropskih državah v praksi sicer ne uporablja zaradi možnosti prenosa PEDV (ang. porcine epidemic diarrhea virus). Možna preventiva proti edemski bolezni so IgY protitelesa iz jajčnega rumenjaka, pridobljenega iz jajc cepljenih kokoši, za humoralno zaščito pred F4 in F18 pozitivno kolonizacijo *E. coli*, a uporaba ni bila učinkovita v vseh kliničnih študijah. Učinkuje tudi uporaba antiseruma s toksoidom Stx2e senzibiliziranih konjev (Fairbrother in Nadeau, 2019).

Aktivni načini imunizacije vključujejo cepljenje s STEC Stx2e gensko atenuiranimi sevi, bakterini ali z inaktiviranim toksinom. Pujskom se lahko dva dni pred odstavitvijo peroralno aplicira mutiran sev STEC Stx2e v kapsulah, ki po štiri dni trajajoči revakcinaciji zagotavlja popolno zaščito proti edemski bolezni. Novejše cepivo vsebuje gensko spremenjen STEC Stx2e sev, ki je sposoben izločati spremenjen toksin Stx2e. Aplicira se dva dni pred odstavitvijo. Cepljeni pujski razvijejo sistemska IgG protitelesa in visok titer specifičnih IgA protiteles proti toksinu Stx2e, ki so zaznavna v fecesu. Učinkovita je tudi uporaba toksina Stx2e, inaktiviranega z glutaraldehidom, in apliciranega prvi in tretji teden po prasiatvi. Cepivo s tako inaktiviranim toksinom še ni komercialno dostopno, a njegova uporaba prepreči pojav kliničnih znamenj bolezni (Oanh, 2012; Piñeyro, 2016)

V Evropi in Kanadi se za preprečevanje pojava edemske bolezni trenutno uporabljajo rekombinantna cepiva in cepiva z gensko spremenjenim toksoidom Stx2e. Pujskom se aplicirajo četrti dan po prasiatvi. Tri tedne po cepljenju se pojavijo nevtralizacijska protitelesa, ki so prisotna do tri mesece po cepljenju, in ob eksperimentalni okužbi s patotipom EDEC preprečijo pojav subklinične in klinične edemske bolezni (Piñeyro, 2016; Fairbrother in Nadeau, 2019).

Eksperimentalno se za kontrolo izbruhov drisk odstavljenecv uporablja tudi komponentno cepivo s prečiščenimi F4 *E. coli*, ki lahko vsebuje tudi F18 fimbrije in adjuvantni sluznični

kolera toksin (CT), ki je sposoben spodbujati nastanek specifičnega lokalnega imunskega odziva proti drugim antigenom v prebavilih in zmanjša fekalno ekskrecijo patogenih F4 *E. coli*, ne pa tudi F18 *E. coli* (Fairbrother in Nadeau, 2019). Razvita so tudi specifična komponentna cepiva proti F18 fimbrijskem adhezinu, a tudi ta so le delno učinkovita, saj sprožijo nastanek protiteles proti delu fimbrijskega adhezina F18, kar pa ne zadostuje za popolno preprečitev adhezije bakterije na sluznico tankega črevesja (Oanh, 2012; Piñeyro, 2016).

Živa atenuirana cepiva so učinkovita proti F4 in F18 pozitivnim sevom *E. coli*. V državah Severne Amerike za nedavno odstavljenе prašiče proti edemski bolezni komercialno uporabljajo preventivna živa peroralna cepiva na osnovi F18 *E. coli*, za katera zaenkrat še ni raziskav o učinkovitosti. Kanadski rejci uporabljajo bivalentno cepivo proti živemu atenuiranemu F4 in F18 pozitivnemu sevu *E. coli*, ki je registrirano za F4 in F18 podstavitveno drisko in F18 edemsko bolezen. V Evropi je registrirano komercialno peroralno živo cepivo proti F18ac *E. coli* (Fairbrother in Nadeau, 2019).

V Sloveniji je proti edemski bolezni na voljo Vepured® suspenzija za injiciranje pujskov od drugega dne starosti, ki vsebuje rekombinantni modificiran in inaktiviran verotoksin 2e in dva adjuvansa. To sta aluminijev hidroksid, ki spodbuja tvorbo serumskih protiteles (Charerntantanakul, 2020), in dietilaminoetil (DEAE), ki je polikationski derivat dekstrana, ki izboljša primarni imunski odziv z zmanjšanjem časa, potrebnega za začetek IgG produkcije, ter spodbuja tvorbo protiteles (Petrovsky in Cooper, 2012). Samo en odmerek cepiva nudi dolgotrajno imunsko zaščito pred edemsko boleznijo, ki traja od odstavitve do konca pitanja. Prisotnost maternalnih protiteles ne zavre imunskega odziva na cepivo. Uspešno vakcinirani pujski kažejo manj kliničnih znamenj in izgub zaradi poginov ter manjšega prirasta.

## 1.5 EDEMSKA BOLEZEN V SLOVENIJI IN SVETU TER PREDHODNE RAZISKAVE PREVALENCE

V Sloveniji do danes še ni bilo izvedenega sistematičnega nadzora, s katerim bi ugotavljali prevalenco edemske bolezni pri tekačih in pitancih, zato stopnja pojavnosti bolezni ni znana.

Geografsko najbližjo raziskavo o prevalenci edemske bolezni so nedavno objavili v Nemčiji (Berger in sod., 2023), kjer so v 99 rejah prašičev z neznanim zdravstvenim statusom za edemsko bolezen vzorčili tekače, stare 5–8 tednov. V vseh rejah so vzorčili po pet boksov tekačev iz te starostne skupine, in sicer vzorce fecesa in brise škornjev (ang. boot swabs), kar

pomeni neinvazivno metodo vzorčenja skupinskega vzorca fecesa s tal boksa. Najbolj uporabni so za detekcijo *E. coli* v prasiliščih. Vzorce se pridobi s škornjev, prevlečenih s sterilno plastično nogavico za enkratno uporabo in polietilensko prevleko na zunanji strani, s katerimi se hodi po boksu (Barth in sod., 2021). V 50 rejah so z bombažnimi vrvmi vzorčili tudi ustno tekočino. Izolacijo STEC iz bakterijske kulture so kombinirali z duplex PCR za glavna faktorja virulence patotipa STEC, to sta gen za toksin Stx2e in gen za fedA beljakovinsko podenoto fimbrijskega antigena F18. Prisotnost toksina Stx2e je bila s tema metodama potrjena na 53,5 % vzorčenih rej, od tega v 35,1 % vzorčenih boksov, medtem ko so patotip EDEC potrdili s 37,4 % prevalenco v 24,9 % vzorčenih boksov.

V Združenih državah Amerike so leta 2012 izvedli longitudinalno študijo, kjer so v vzorcih fecesa 150 pitancev dokazovali prisotnost patotipa STEC. Vzorciti so začeli, ko so bili prašiči stari 10 tednov, in zaključili, ko so bili stari 24 tednov. Vzorcili so v treh zaporednih skupinah pitancev. Največjo prevalenco povzročitelja edemske bolezni so zaznali v 14., 16. in 18. tednu starosti; STEC izolati so bili odkriti pri vsaj enem izmed zaporednih vzorcev pri 65,3 % pitancev (Tseng in sod., 2014).

## **2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE**

Glavni cilj raziskovalne naloge je ugotoviti, kolikšna je prevalenca edemske bolezni v slovenskih rejah prašičev, ki imajo vsaj 20 plemenskih svinj. Hkrati smo želeli preveriti, kako na pojavnost edemske bolezni vpliva izvajanje biovarnostnih ukrepov.

V okviru raziskovalne naloge smo postavili naslednje hipoteze:

1. Prevalenca edemske bolezni v slovenskih rejah prašičev je primerljiva z ostalimi državami.
2. Prevalenca edemske bolezni je višja v večjih rejah (reje z več kot 500 prašiči) kot v manjših rejah (reje z manj kot 500 prašiči) prašičev.
3. Hlevske reje imajo nižjo prevalenco edemske bolezni kot reje z izpustom.
4. Reje, kjer sami mešajo krmo, imajo višjo prevalenco edemske bolezni kot reje, kjer uporabljajo komercialno krmo.
5. V rejah, kjer kupljene prašiče namestijo v karanteno, redkeje dokažemo povzročitelja edemske bolezni kot v rejah brez karantene.

6. Reje, ki so v preteklosti že imele izbruhe edemske bolezni, imajo višjo prevalenco bolezni.
7. Najvišja prevalenca edemske bolezni je pri tekačih, starih 5–6 tednov, in tekačih v starosti 7–8 tednov.

## **3 MATERIALI IN METODE**

### **3.1 MATERIALI**

Za izvedbo raziskovalne naloge smo anketirali rejce prašičev in vzorčili ustno tekočino tekačev in pitancev, pridobljeno z ožemanjem bombažnih vrvi iz diagnostičnega kompleta Verocheck® španskega proizvajalca Hipra.

#### **3.1.1 Reje**

V obdobju od 4. januarja 2024 do 7. maja 2024 smo obiskali skupno štiriindvajset komercialnih rej prašičev, od tega šestnajst v štajerski statistični regiji in osem v prekmurski statistični regiji. Vse reje so imele minimalno dvajset plemenskih svinj. Dodatno smo anketirali še trinajst predhodno vzorčenih komercialnih rej, prav tako z vsaj dvajsetimi plemenskimi svinjami, in sicer deset iz štajerske statistične regije, dve iz dolenske statistične regije in eno iz prekmurske statistične regije.

Reje so bile izbrane naključno na podlagi števila plemenskih svinj in privoljenja lastnikov. V istem dnevu smo obiskali največ štiri reje; zaradi biovarnostnih ukrepov je vsak izmed vzorčevalcev vstopil le na eno izmed rej na dan.

#### **3.1.2 Ustna tekočina in Verocheck®**

Ustno tekočino tekačev in pitancev smo vzorčili z Verocheck® testnim kompletom za edemsko bolezen. Posamezen komplet je vseboval štiri bombažne vrvi, štiri plastične vrečke, štiri plastične epruvete z zamaškom, štiri plastične kapalke s prostornino 100 µl, štiri pare zaščitnih rokavic, navodila za vzorčenje, pisemsko kuverto in štiri zavoječke s FTA testnimi karticami (ang. fast technology for analysis of nucleic acids).



Slika 1: Diagnostični komplet Verocheck/Picture 1: diagnostic kit Verocheck

FTA testne kartice so kartončki, impregnirani s patentirano mešanico kemikalij, ki ob kontaktu z bakterijami v vzorcu razgradijo celično membrano in denaturirajo beljakovine, nukleinske kisline pa imobilizirajo in zaščitijo pred UV žarki ter delovanjem drugih mikrobov in gliv. Patogeni s tem izgubijo infektivno sposobnost, hkrati pa se ohrani njihov genetski material.



Slika 2: FTA kartica/Picture 2: FTA card

Vzorčene so bile 4 starostne kategorije tekačev in pitancev, in sicer prašiči, stari 5–6 tednov (prva starostna skupina), prašiči, stari 7–8 tednov (druga starostna skupina), prašiči, stari 12 tednov (tretja starostna skupina) in prašiči, stari 14 tednov (četrti starostna skupina). V kolikor v reji niso imeli katere izmed teh kategorij, smo vzorčili več boksov iste kategorije ali druge

kategorije. Vzorcev drugih kategorij nismo uporabili v statističnih analizah. V vsakem boksu smo obesili eno vrv tako, da je bila v dosegu prašičev in dovolj odmaknjena od tal, da bi preprečili kontaminacijo. Vrvi smo pustili v boksih vsaj trideset minut.



Slika 3: Prašiči žvečijo bombažno vrv/Picture 3: The pigs are chewing the cotton rope



Slika 4: Vzorčenje ustne tekočine prašičev/Picture 4: Oral fluid sampling in pigs

Vrvi smo po končanem vzorčenju čim bolj sterilno prenesli v plastične vrečke, na katere smo označili starostno kategorijo. Vsako od vrvi smo oželi v svojo vrečko, vrečko prerezali in pridobljeno ustno tekočino prelili v označene epruvete. Pred inokulacijo vzorca na FTA kartice smo epruvete vsaj trikrat dobro premešali. Na vsako kartico smo označili ime reje, starostno kategorijo tekačev in pitancev ter datum vzorčenja. Na sredino označenega kroga na vsaki FTA kartici smo prenesli 200  $\mu$ l vzorca tako, da ni segal čez rob kroga. Med posameznimi

inokulacijami smo zamenjali rokavice, da ne bi prišlo do navzkrižne kontaminacije kartic. FTA kartice smo sušili vsaj eno uro, preden smo jih vstavili v plastične zavojčke z vezalcem vlage in jih priložili v pisemsko kuverto z izpolnjenim vprašalnikom proizvajalca ter jih poslali v Hiprin laboratorij na naslov Avinguda de la Selva 135, 17170 Amer, Girona, Španija.



Slika 5: Nanos vzorca ustne tekočine na FTA kartice/Picture 5: Transferring the pig oral fluid on FTA cards

### 3.1.3 Vprašalnik za rejce

Med 30-minutnim čakanjem na vzorec ustne tekočine smo z rejci izpolnili vprašalnik (Priloga 1). Anketirali smo vse rejce rej, ki smo jih osebno obiskali in vzorčili tekače in pitance. Ankete so bile izvedene preko telefonskega klica ali po elektronski pošti poslane lastnikom ali njihovim izbranim veterinarjem, kjer je bilo vzorčenje z Verocheck® kompletom izvedeno že pred začetkom pisanja te raziskovalne naloge. Do konca vzorčenja smo prejeli 31 popolnih in 5 nepopolnih anket rejcev.

Vprašalnik je vseboval splošna vprašanja o reji in vprašanja o zdravstveni problematiki edemske bolezni. Razdeljen je bil na 5 sklopov vprašanj, in sicer na sklop splošni podatki o reji, sklop biovarnost, sklop reja in prehrana v vzrejališču, sklop zdravstveno varstvo in sklop *E. coli*. Za statistično analizo so bili poleg rezultatov analize vzorcev ustne tekočine vzorčenih tekačev in pitancev uporabljeni podatki o najpomembnejših dejavnikih, ki vplivajo na pojavnost edemske bolezni, pridobljeni s to anketo.

Iz prvega sklopa smo uporabili podatka o vrsti reje in velikosti reje, iz drugega podatek o izvoru prašičev in karanteni, iz tretjega podatek o izvoru krme ter iz petega podatek o preteklih izbruhih edemske bolezni.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 PCR test

Zbrani vzorci so bili po pošti poslani v laboratorij v Girono, kjer so bili pregledani z modificirano metodo RT-PCR. Kvantitativne in kvalitativne rezultate rej smo prejeli po pošti in jih statistično obdelali. V laboratoriju v Španiji so inokulirane FTA kartice preiskali z modificirano fluorescenčno real-time PCR metodo za detekcijo prisotnosti in količine nukleinske kisline za toksin Stx2e. Ta metoda izkorišča 5' nukleazno aktivnost Taq polimeraze za razgradnjo fluorescenčno označene probe (reporter dye na 5' koncu in quencher dye na 3' koncu probe) in omogoča hkratno pomnoževanje ter detekcijo produkta. Za spremljanje potencialnih lažno negativnih rezultatov testa so uporabili 16S rRNA *E. coli* gen, ki omogoči detekcijo *E. coli* iz drugih celičnih sestavin tudi v primeru odsotnosti bakterijske DNA v vzorcu (Frydendahl in sod., 2001).

Uporabljen je bil komplet TaqMan® Universal Master Mix 2x (Applied Biosystems), ki vsebuje AmpliTaq Gold® DNA polimerazo, AmpErase® uracil-N-glikozilazo (UNG), dNTP-je z dUTP, 6-karboksi-X-rodamin (ROX) in optimizirane puferske komponente. ROX je bil uporabljen za notranjo pasivno fluorogeno kontrolo. Viale za izvedbo 5' nukleaznega testa so imele prostornino 20 µl. Vsaki je bilo dodano 600 nM primerja za faktor virulence STx2e, 75 nM 16S rRNA primerja, 200 nM probe, označene s FAM in TET fluorescenčnim barvilom, 10 µl TaqMan® Universal Master Mixa in sterilna destilirana voda do skupnega volumna 18 µl. V to zmes sta bila neposredno pred izvedbo testiranja dodana 2 µl razredčenih lizatov, pridobljenih s FTA kartic. Viale so neprodušno zaprli z MicroAmp® optičnimi zamaški (Applied Biosystems). Serija 80–100 vial z vsemi reagenti razen vzorčne DNA je bila za hitrejšo izvedbo testov in za preprečevanje potencialne navzkrižne kontaminacije pripravljena vnaprej in skladiščena z zamrzovanjem na -20 °C (Frydendahl in sod., 2001).

Tako pripravljene viale so bile pred uporabo odmrznjene in jim je bila dodana vzorčna DNA. Cikel pomnoževanja je vseboval inkubacijo vial 2 minuti na temperaturi 50 °C za optimalno aktivnost AmpErase® UNG encima, in 10 minut na temperaturi 95 °C za aktivacijo AmpliTaq

Gold® DNA polimeraze in inaktivacijo AmpErase® UNG encima. Sledilo je 40 ciklov, sestavljenih iz 15 sekund na 95 °C in ene minute na 60 °C. Pomnoževanje DNA produkta je bilo izvedeno v ABI prism® 7700 Sequence Detection System, ki je vseboval 96 jamic za termalni cikel, fluorescenčni sistem detekcije DNA produktov in program za obdelavo podatkov. Med izvajanjem PCR je bila fluorescenca vsake izmed 96 jamic preverjana vsakih 7 sekund (Frydendahl in sod., 2001).

Zadnje tri meritve med pomnoževanjem DNA so bile uporabljene za izračun  $\Delta R_n$  vrednosti. RN (ang. normalised reporter) je intenzivnost fluorescence, ki jo oddaja reporter dye, deljena s fluorescenco, ki jo oddaja pasivno referenčno barvilo. Delta Rn ( $\Delta R_n$ ) je izračunana kot Rn vrednost minus spodnja meja intenzitete fluorescence reporter dye v prvih nekaj ciklih PCR reakcije (ang. unreacted sample). Prag je bil avtomatsko določen z uporabo Sequence Detection software kot 10 standardnih deviacij nad srednjo vrednostjo osnovne fluorescence v zgodnjih ciklih PCR reakcije. Kot zgodnji cikli PCR reakcije so bili definirani cikli 3–15. Pražni cikel PCR (Ct) je bil določen avtomatsko s Sequence Detection software kot številka cikla, kjer je  $\Delta R_n$  vrednost preseгла zgoraj omenjen prag detekcije. Ker je Sequence Detection software sposoben razlikovati valovne dolžine različnih fluorescenčnih barvil, je možna hkratna obdelava večjega števila vzorcev z metodo multiplex PCR (Frydendahl in sod., 2001).

Rezultati real-time PCR so bili pozitivni na prisotnost gena za toksin Stx2e, če je bila izračunana Ct vrednost manjša od 38,5, ter razvrščeni v štiri razrede glede na količino dokazanega produkta genetskega materiala. V vzorcih, označenih kot NEG, niso zaznali genetskega materiala testiranega patogena, v vzorcih, označenih kot POS (+), so zaznali majhno količino genetskega materiala testiranega patogena, v vzorcih, označenih kot POS (++) , so zaznali zmerno količino genetskega materiala testiranega patogena, v vzorcih, označenih kot POS (+++) , pa so zaznali veliko količino genetskega materiala testiranega patogena. Rezultati so bili podani za vzorce posameznih starostnih skupin odstavljenecv in ne za reje kot celoto.

### **3.2.2 Statistična analiza**

Za statistično analizo so bili uporabljeni rezultati vseh 36 rej, ki so imele izpolnjen tudi vprašalnik. Za analizo prisotnosti edemske bolezni v odvisnosti od posameznih epizootioloških dejavnikov tveganja (epizootiološke podatke smo pridobili z vprašalnikom za rejce) smo uporabili podatek o prisotnosti povzročitelja edemske bolezni v reji kot celoti. Zato smo vsako

rejo, kjer je bila vsaj ena izmed vzorčenih starostnih skupin tekačev ali pitancev pozitivna na genetski material za toksin Stx2e, definirali kot pozitivno na prisotnost patotipov *E. coli*, ki izločajo verotoksin.

Za statistično analizo smo uporabili test predznakov, Fisherjev natančni test, test enakih deležev in Wilcoxonov test v računalniškem programu Software Package Version 4.3.2.

Test predznakov (ang. sign test) je neparametrični test za preverjanje hipoteze o vrednosti mediane  $m$  zvezne slučajne spremenljivke  $X$ . Za mediano  $m$  velja  $P(X \leq m) = P(X \geq m) = 1/2$  in je v primeru simetrične porazdelitve enaka povprečni vrednosti. Testiramo, ali ima binomska porazdelitev enako verjetnost uspeha (= pojav bolezni) in neuspeha (= ni pojava bolezni) ob stopnji značilnosti 0,05 (lahko tudi 0,1 zaradi majhnih vzorcev). Interval 95 % zaupanja za mediano je podinterval  $[0,1]$ .

Fisherjev natančni test (ang. Fisher's exact test for count data) je neparametrični test, ki preverja ničelno hipotezo, ali je razmerje deležev uspehov v dveh primerjanih vzorcih enako 1 (= deleža pojava bolezni v obeh vzorcih sta enaka). Če je  $p$ -vrednost  $< 0,05$  (lahko tudi 0,1 zaradi majhnih vzorcev), to ničelno hipotezo zavrnamo in sprejmemo možnost, da imata primerjana vzorca različna deleža uspehov (= pojav bolezni). Interval 95 % zaupanja za deležev uspehov obeh vzorcev je podinterval  $[0, \infty)$ .

Test enakih deležev (ang. test of equal or given proportions) je neparametrični test, ki preverja ničelno hipotezo, ali sta deleža uspehov v dveh primerjanih vzorcih enaka (= delež pojava bolezni v 1. vzorcu je enak deležu pojava bolezni v 2. vzorcu). Če je  $p$ -vrednost  $< 0,05$  (lahko tudi 0,1 zaradi majhnih vzorcev), to ničelno hipotezo zavrnamo in sprejmemo možnost, da imata primerjana vzorca različna deleža uspehov (= pojav bolezni). Interval 95 % zaupanja za razliko deležev je podinterval  $[-1,1]$ .

Wilcoxonov test (ang. unpaired two-samples Wilcoxon test ali Wilcoxon rank sum test ali Mann-Whitney test) je neparametrični test, ki preverja ničelno hipotezo, ali imata dva vzorca enaki mediani. Če je  $p$ -vrednost  $< 0,05$  (lahko tudi 0,1 zaradi majhnih vzorcev), to ničelno hipotezo zavrnamo in sprejmemo možnost, da imata primerjana vzorca različni mediani (= pojav bolezni). Interval 95 % zaupanja za razliko median je podinterval  $[-1,1]$ .

Z zgoraj opisanimi statističnimi testi smo proučili rezultate real time PCR testov in podatke o rejah iz izpolnjenih anket, in sicer vpliv velikosti reje, vrste reje prašičev, izvora krme, prisotnosti karantene za prašiče, vnesene v rejo iz drugod in predhodne prisotnosti edemske bolezni na trenutno prisotnost edemske bolezni v rejah. Zanimala nas je tudi primerjava prevalece med štirimi vzorčenimi starostnimi skupinami tekačev in pitancev.

## **4 REZULTATI**

### **4.1 REZULTATI PCR**

Iz Hipre smo prejeli rezultate RT-PCR skupno 37 vzorčenih rej. Od tega je bila na 24 rejah na gen za toksin Stx2e pozitivna vsaj ena izmed vzorčenih starostnih skupin tekačev in pitancev, torej je v Sloveniji 64,9 % prevalenca edemske bolezni.

Rezultati PCR testa so predstavljeni v sledeči tabeli (Tabela 1).

Tabela 1: Rezultati RT-PCR analize vzorcev ustne tekočine/ Table 1: Results of RT-PCR analysis of oral fluid samples

| Reja | Starost prašičev |   |    |   |            |     |     |    |           |   |   |   |           |   |   |   |
|------|------------------|---|----|---|------------|-----|-----|----|-----------|---|---|---|-----------|---|---|---|
|      | 5–6 tednov       |   |    |   | 7–8 tednov |     |     |    | 12 tednov |   |   |   | 14 tednov |   |   |   |
| 1    | -                |   |    |   | ++         |     |     |    | -         |   |   |   | -         |   |   |   |
| 2    | +                |   | ++ |   | +          |     | +   |    | +         |   | + |   | -         |   | + |   |
| 3    | /                |   |    |   | +++        |     |     |    | /         |   |   |   | /         |   |   |   |
| 4    | -                |   |    |   | -          |     |     |    | /         |   |   |   | -         |   |   |   |
| 5    | -                |   |    |   | -          |     |     |    | -         |   |   |   | /         |   |   |   |
| 6    | -                |   |    |   | -          |     |     |    | +         |   |   |   | +         |   |   |   |
| 7    | -                |   |    |   | +          |     |     |    | ++        |   |   |   | ++        |   |   |   |
| 8    | /                |   |    |   | +++        |     |     |    | +         |   |   |   | ++        |   |   |   |
| 9    | +++              |   |    |   | +++        |     |     |    | +         |   |   |   | +         |   |   |   |
| 10   | /                |   |    |   | /          |     |     |    | /         |   |   |   | -         |   |   |   |
| 11   | -                |   |    |   | -          |     |     |    | -         |   |   |   | -         |   |   |   |
| 12   | -                |   |    |   | -          |     | -   |    | /         |   |   |   | /         |   |   |   |
| 13   | -                |   |    |   | ++         |     |     |    | ++        |   |   |   | /         |   |   |   |
| 14   | -                |   |    |   | -          |     |     |    | /         |   |   |   | -         |   |   |   |
| 15   | /                |   |    |   | -          |     |     |    | /         |   |   |   | +         |   |   |   |
| 16   | -                |   |    |   | -          |     |     |    | -         |   |   |   | +         |   |   |   |
| 17   | -                |   |    |   | -          |     |     |    | +         |   |   |   | -         |   |   |   |
| 18   | -                |   |    |   | -          |     |     |    | -         |   |   |   | -         |   |   |   |
| 19   | -                |   |    |   | -          |     |     |    | -         |   |   |   | -         |   |   |   |
| 20   | -                | - | -  | - | -          | -   | -   | -  | -         | - | - | - | -         | - | - | - |
| 21   | -                |   |    |   | -          |     |     |    | -         |   |   |   | /         |   |   |   |
| 22   | ++               |   |    |   | +          |     |     |    | ++        |   |   |   | -         |   |   |   |
| 23   | ++               |   |    |   | ++         |     |     |    | ++        |   |   |   | ++        |   |   |   |
| 24   | -                |   |    |   | -          |     |     |    | /         |   |   |   | /         |   |   |   |
| 25   | -                | - | -  | - | -          | -   | -   | -  | -         | - | - | - | +         | - | - | - |
| 26   | ++               |   |    |   | +++        |     |     |    | ++        |   |   |   | /         |   |   |   |
| 27   | +                | - | ++ | + | +++        | +++ | +++ | ++ | /         |   |   |   | +         | - | - | - |
| 28   | -                | - | -  | - | -          | -   | -   | -  | -         | - | - | - | -         | - | - | - |
| 29   | /                |   |    |   | +          |     |     |    | +++       |   |   |   | /         |   |   |   |
| 30   | -                |   |    |   | -          |     |     |    | -         |   |   |   | -         |   |   |   |
| 31   | +                |   |    |   | -          |     |     |    | +         |   |   |   | +         |   |   |   |
| 32   | +                |   |    |   | -          |     |     |    | -         |   |   |   | -         |   |   |   |
| 33   | /                |   |    |   | +          |     |     |    | ++        |   |   |   | +         |   |   |   |
| 34   | +++              |   |    |   | /          |     |     |    | ++        |   |   |   | ++        |   |   |   |
| 35   | ++               |   |    |   | ++         |     |     |    | +         |   |   |   | /         |   |   |   |
| 36   | ++               |   |    |   | ++         |     |     |    | /         |   |   |   | +         |   |   |   |
| 37   | -                |   |    |   | -          |     |     |    | -         |   |   |   | -         |   |   |   |

Legenda za tabelo 1: (-) pomeni, da test ni zaznal genetskega materiala testiranega patogena; (+) pomeni, da je test zaznal majhno količino testiranega patogena; (++) pomeni, da je test zaznal zmerno količino testiranega patogena; (+++) pomeni, da je test zaznal veliko količino testiranega patogena; (/) pomeni, da ni bilo vzorca za testiranje. Ct vrednost za določanje prisotnosti genetskega materiala VT2e je bila manjša od 38,5.

Legend for table 1: (-) means the test has detected no genetic material of the tested pathogens; (+) means the test has detected a low quantity of genetic material of the tested pathogens; (++) means the test has detected moderate quantity of genetic material of the tested pathogens; (+++) means the test has detected a large quantity of genetic material of the tested pathogens; and (/) means there was no sample to test. Ct value for positive sample was determined as lower than 38.5.

V nekaterih rejah (reja 3, 8, 15 in 29) pri najmlajši vzorčeni kategoriji tekačev nismo dobili zadostne količine ustne tekočine za nanos na FTA kartice, v reji 14 pa so prašiči iz tretje vzorčene starostne kategorije vrv med vzorčenjem odgriznili in jo povlekli na tla, zato je bil vzorec kontaminiran s fecesom in neprimeren za nadaljnjo uporabo. Nekatere reje niso imele vseh ustreznih starostnih kategorij prašičev, zato tam nismo vzorčili vseh štirih zahtevanih starostnih kategorij prašičev. To so bile reje 3, 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 34, 35 in 36.

## 4.2 REZULTATI ANKET

Ankete je izpolnilo 36 rejcev, od tega 25 iz štajerske (Š), 9 iz prekmurske (P) in 2 iz dolenske (D) statistične regije. Od tega je 33 rejcev anketo izpolnilo v celoti, 4 samo delno, 1 rejec ankete ni izpolnil (reja 22). Rezultati anket so prikazani v Tabeli 2.

Tabela 2: Podatki o rejah in njihovi tehnologiji/Table 2: Information on farms and their technology

| Reja | Statistična regija | Vrsta reje | Št. prašičev v reji | Karantena | Izvor krme  | Edemska bolezen v preteklosti |
|------|--------------------|------------|---------------------|-----------|-------------|-------------------------------|
| 1    | Š                  | Izpust     | 700                 | Ne        | Lastna      | Da                            |
| 2    | Š                  | Hlev       | 1200–1400           | Ne        | Lastna      | Da                            |
| 3    | P                  | Hlev       | 1100                | Da        | Komercialna | Da                            |
| 4    | P                  | Hlev       | 780                 | Ne        | Komercialna | Da                            |
| 5    | Š                  | Izpust     | 691                 | Da        | Komercialna | Da                            |
| 6    | Š                  | Hlev       | 242                 | Da        | Komercialna | Da                            |
| 7    | Š                  | Hlev       | 390                 | Ne        | Lastna      | Da                            |
| 8    | P                  | Izpust     | 500                 | Da        | Komercialna | Da                            |
| 9    | P                  | Hlev       | 340                 | Da        | Komercialna | Da                            |
| 10   | Š                  | Izpust     | 300                 | Da        | Lastna      | Da                            |
| 11   | Š                  | Izpust     | 835                 | Ne        | Komercialna | Da                            |
| 12   | Š                  | Izpust     | 352                 | Da        | Komercialna | Da                            |
| 13   | P                  | Hlev       | 315                 | Da        | Lastna      | Da                            |
| 14   | Š                  | Izpust     | <500                | Da        | Komercialna | Da                            |
| 15   | P                  | Hlev       | 385                 | Da        | Komercialna | Ne                            |
| 16   | P                  | Hlev       | 740                 | Ne        | Komercialna | Ne                            |
| 17   | P                  | Izpust     | 703                 | Da        | Komercialna | Ne                            |
| 18   | P                  | Izpust     | 980                 | Da        | Komercialna | Ne                            |
| 19   | Š                  | Hlev       | 720                 | Ne        | Komercialna | Ne                            |
| 20   | Š                  | Izpust     | 2500                | Da        | Komercialna | Ne                            |
| 21   | Š                  | Hlev       | 1384                | Da        | Lastna      | Ne                            |
| 22   | P                  | /          | /                   | /         | /           | /                             |
| 23   | Š                  | Hlev       | >500                | Da        | Lastna      | Da                            |
| 24   | Š                  | Izpust     | <500                | Da        | Lastna      | Da                            |
| 25   | D                  | Hlev       | 9200                | Da        | Komercialna | Da                            |
| 26   | Š                  | Hlev       | 2258                | Da        | Lastna      | Da                            |
| 27   | Š                  | Izpust     | 3200                | Da        | Komercialna | Ne                            |
| 28   | D                  | Hlev       | 17500               | Da        | Komercialna | Ne                            |
| 29   | Š                  | Hlev       | >500                | Ne        | Lastna      | Ne                            |
| 30   | Š                  | Izpust     | 121                 | Ne        | Lastna      | Ne                            |
| 31   | Š                  | Hlev       | 598                 | Ne        | Lastna      | Da                            |
| 32   | Š                  | Hlev       | 550                 | Da        | Komercialna | Da                            |
| 33   | Š                  | Hlev       | 700                 | Da        | Lastna      | Ne                            |
| 34   | Š                  | Hlev       | 300                 | Da        | Lastna      | Da                            |
| 35   | Š                  | Izpust     | 220                 | Ne        | Lastna      | Ne                            |
| 36   | Š                  | Hlev       | 188                 | Da        | Lastna      | Ne                            |
| 37   | Š                  | Hlev       | 450                 | Ne        | Lastna      | Ne                            |

Legenda za tabelo 2: (Š) pomeni štajersko statistično regijo, (P) pomeni prekmursko statistično regijo, (D) pomeni dolensko statistično regijo.

Legend for table 2: (Š) means Štajerska statistic region, (P) means Prekmurje statistic region, (D) means Dolenjska statistic region.

## 4.3 STATISTIČNA ANALIZA

### 4.3.1 Velikost reje

Reje smo razdelili na velike (vsaj 500 prašičev) in majhne (manj kot 500 prašičev). Proučili smo prevalenco bolezni v dvajsetih velikih rejah in šestnajstih majhnih rejah. Prevalenca edemske bolezni v velikih rejah se statistično ne razlikuje značilno od prevalece v malih rejah. Preverili smo jo s Fisherjevim natančnim testom, testom enakih deležev in Wilcoxonovim testom za reje kot celoto in za posamezne starostne skupine prašičev, kot je prikazano v Tabeli 3.

Tabela 3: Prevalenca edemske bolezni glede na velikost farme in starostno skupino prašičev/ Table 3: Prevalence of edema disease depending on the size of the farm and the age group of pigs

| Starost prašičev | Št. pozitiv. velikih rej | Skupno število velikih rej | Št. pozitiv. majhnih rej | Skupno št. majhnih rej | Fisherjev natančni test (p-vrednost) | Test enakih deležev (p-vrednost) | Wilcoxonov test (p-vrednost) |
|------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 5–6 tednov       | 6                        | 17                         | 4                        | 13                     | 1.0000000                            | 0.8534930                        | 0.81767875                   |
| 7–8 tednov       | 8                        | 18                         | 5                        | 13                     | 1.0000000                            | 0.8306757                        | 0.76090673                   |
| 12 tednov        | 6                        | 16                         | 8                        | 11                     | 0.1201119                            | 0.3179239                        | 0.08222865                   |
| 14 tednov        | 7                        | 14                         | 7                        | 12                     | 0.7126881                            | 0.8162752                        | 0.69882672                   |
| Skupno           | 27                       | 65                         | 24                       | 49                     | 0.4524627                            | 0.6261244                        | 0.43290761                   |



### 4.3.2 Vrsta reje

Proučili smo prevalenco edemske bolezni v dvaindvajsetih hlevskih rejah in štirinajstih hlevskih rejah z izpustom. Statistično značilna je večja prevalenca edemske bolezni v hlevskih rejah v primerjavi s prevalenco edemske bolezni v hlevskih rejah z izpustom, in sicer s Fisherjevim natančnim testom, s testom enakih deležev in z Wilcoxonovim testom. Prevalenca edemske bolezni v četrti starostni kategoriji v hlevskih rejah je statistično značilno večja od prevalece v četrti starostni skupini v hlevskih rejah z izpustom. To smo prikazali s Fisherjevim natančnim testom, testom enakih deležev in z Wilcoxonovim testom. Razlika med hlevskimi rejami in hlevskimi rejami z izpustom pri drugih starostnih kategorijah ni statistično značilna. Rezultati statističnih analiz vpliva vrste reje na prevalenco edemske bolezni so prikazani v Tabeli 4.

Tabela 4: Prevalenca edemske bolezni glede na tip reje in starostno kategorijo prašičev/ Table 4: Prevalence of edema disease depending on the type of the farm and the age group of pigs

| Starost prašičev | H+ | H  | I+ | I  | Fisherjev natančni test (p-vrednost) | Test enakih deležev (p-vrednost) | Wilcoxonov test (p-vrednost) |
|------------------|----|----|----|----|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 5–6 tednov       | 9  | 20 | 1  | 10 | 0.1007607                            | 0.152399588                      | 0.0631857932                 |
| 7–8 tednov       | 11 | 21 | 2  | 10 | 0.1285003                            | 0.251541324                      | 0.0978318710                 |
| 12 tednov        | 12 | 20 | 2  | 7  | 0.2086957                            | 0.393165360                      | 0.1695706760                 |
| 14 tednov        | 14 | 19 | 0  | 7  | 0.001204013                          | 0.032560039                      | 0.0011761536                 |
| Skupno           | 46 | 80 | 5  | 34 | 0.00002593004                        | 0.005153082                      | 0.0000289016                 |

Legenda za tabelo 4: (H+) pomeni število pozitivnih hlevskih rej; (H) pomeni število vseh hlevskih rej; (I+) pomeni število pozitivnih rej z izpustom; (I) pomeni število vseh rej z izpustom.

Legend for table 4: (H+) means the number of positive farms with indoor-only husbandry; (H) means the total number of farms with indoor-only husbandry; (I+) means positive farms with indoor husbandry with an access to outside pens; (I) means the total number of farms with indoor husbandry with an access to outside pens.

### 4.3.3 Krma

Proučevali smo prevalenco edemske bolezni v devetnajstih rejah, kjer kupujejo komercialno krmo, in v sedemnajstih rejah, kjer za odstavljenecv krmo mešajo sami. Prevalenca bolezni je pri tretji starostni skupini prašičev statistično značilno večja v rejah, kjer krmo mešajo sami. Preverili smo jo s Fisherjevim natančnim testom in Wilcoxonovim testom. S Fisherjevim natančnim testom, testom enakih deležev in Wilcoxonovim testom je bila potrjena tudi statistična značilnost pogostejšega pojavljanja edemske bolezni v rejah, kjer krmo mešajo sami, ne glede na starostno kategorijo tekačev in odstavljenecv. Pri ostalih posameznih starostnih kategorijah razlika ni bila statistično značilna. Rezultati statističnih testov prevalece glede na izvor krme so prikazani v Tabeli 5.

Tabela 5: Prevalenca edemske bolezni glede na izvor krme in starostno kategorijo prašičev/ Table 5: Prevalence of edema disease depending on the origin of the feed and the age group of pigs

| Starost prašičev | K+ | K  | L+ | L  | Fisherjev natančni test (p-vrednost) | Test enakih deležev (p-vrednost) | Wilcoxonov test (p-vrednost) |
|------------------|----|----|----|----|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 5–6 tednov       | 3  | 16 | 7  | 14 | 0.1216391804                         | 0.20067887                       | 0.079168122                  |
| 7–8 tednov       | 4  | 16 | 9  | 15 | 0.0731727515                         | 0.20520133                       | 0.055068144                  |
| 12 tednov        | 3  | 13 | 10 | 14 | 0.0213009079                         | 0.12952439                       | 0.014791530                  |
| 14 tednov        | 7  | 15 | 8  | 11 | 0.2462949253                         | 0.49528307                       | 0.203114836                  |
| Skupno           | 17 | 60 | 34 | 54 | 0.0003056372                         | 0.02166418                       | 0.000221345                  |

Legenda za tabelo 5: (K+) pomeni število pozitivnih rej, ki uporabljajo komercialno krmo; (K) pomeni skupno število rej, ki uporabljajo komercialno krmo; (L+) pomeni število pozitivnih rej, ki uporabljajo lastno krmo; (L) pomeni skupno število rej, ki uporabljajo lastno krmo.

Legend for table 5: (K+) means the number of positive farms, which use commercial feed; (K) means the total number of farms that use commercial feed; (L+) means the number of positive farms which use their own feed; (L) means the total number of farms which use their own feed.

#### **4.3.4 Karantena**

Proučili smo prevalenco edemske bolezni v dvaindvajsetih rejah, kjer imajo za nove prašiče urejeno karanteno, v primerjavi s trinajstimi rejami, kjer karantene nimajo. Samo eden izmed rejcev ne kupuje prašičev in čredo obnavlja z mladnicami iz lastne reje, zato podatki te reje (reja 16) niso bili uporabljeni v statistični analizi te hipoteze. Prevalenca edemske bolezni v rejah, kjer imajo za kupljene prašiče uvedeno karanteno, se statistično značilno ne razlikuje od rej, kjer za kupljene prašiče nimajo uvedene karantene. Hipotezo smo za skupni vzorec starostnih kategorij rej preverili s Fisherjevim testom, testom enakih deležev in Wilcoxonovim testom. Rezultati statističnih testov glede na prisotnost karantene so predstavljeni v Tabeli 6.

Tabela 6: Prevalenca edemske bolezni glede na izvajanje karantene in starostno kategorijo prašičev/ Table 6: Prevalence of edema disease depending on the presence of quarantine and the age group of pigs

| Starost prašičev | K+ | K  | B+ | B  | Fisherjev natančni test (p-vrednost) | Test enakih deležev (p-vrednost) | Wilcoxonov test (p-vrednost) |
|------------------|----|----|----|----|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 5–6 tednov       | 6  | 17 | 4  | 12 | 1.0000000                            | 0.9390482                        | 0.93573448                   |
| 7–8 tednov       | 7  | 17 | 6  | 13 | 1.0000000                            | 0.8641878                        | 0.80748438                   |
| 12 tednov        | 7  | 15 | 6  | 11 | 1.0000000                            | 0.8193821                        | 0.71936528                   |
| 14 tednov        | 10 | 14 | 4  | 11 | 0.1159948                            | 0.3420932                        | 0.09179341                   |
| Skupno           | 30 | 63 | 20 | 47 | 0.6993478                            | 0.7458555                        | 0.60171286                   |

Legenda za tabelo 6: (K+) pomeni število pozitivnih rej, kjer izvajajo karanteno; (K) pomeni skupno število rej, kjer izvajajo karanteno; (B+) pomeni število pozitivnih rej brez karantene; (B) pomeni skupno število rej brez karantene.

Legend for the table 6: (K+) means the number of positive farms that have quarantine; (K) means the total number of farms that have quarantine; (B+) means the number of positive farms that do not have quarantine; (B) means the total number of farms that do not have quarantine.

#### 4.3.5 Predhodni izbruhi edemske bolezni

Proučili smo dvaindvajset rej, kjer so v preteklosti že imeli edemsko bolezen, in štirinajst rej, kjer edemske bolezni v preteklosti še nikoli niso imeli. Reje, kjer so v preteklosti že imeli izbruhe edemske bolezni, nimajo statistično značilno večje prevalece edemske bolezni kot reje, kjer bolezni še nikoli niso imeli. Hipotezo smo preverili s Fisherjevim testom, testom enakih deležev in Wilcoxonovim testom. Rezultati statističnih testov glede na predhodno prisotnost edemske bolezni v rejah so predstavljeni v Tabeli 7.

Tabela 7: Prevalenca edemske bolezni glede na prisostnost izbuhov edemske bolezni v preteklosti in starostno kategorijo prašičev/ Table 7: Prevalence of edema disease depending on the outbursts of edema disease in the past and the age group of pigs

| Starost prašičev | P+ | P  | N+ | N  | Fisherjev natančni test (p-vrednost) | Test enakih deležev (p-vrednost) | Wilcoxonov test (p-vrednost) |
|------------------|----|----|----|----|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 5–6 tednov       | 7  | 19 | 3  | 11 | 0.7019952                            | 0.7018833                        | 0.6167552                    |
| 7–8 tednov       | 9  | 19 | 4  | 12 | 0.4840346                            | 0.6173873                        | 0.4622780                    |
| 12 tednov        | 9  | 15 | 5  | 12 | 0.4494818                            | 0.5905363                        | 0.3673237                    |
| 14 tednov        | 9  | 16 | 5  | 10 | 1.0000000                            | 0.8640789                        | 0.7837220                    |
| Skupno           | 34 | 69 | 17 | 45 | 0.2524384                            | 0.4516966                        | 0.2308674                    |

Legenda za tabelo 7: (P+) pomeni število pozitivnih rej, kjer so v preteklosti že imeli izbruhe edemske bolezni; (P) pomeni število vseh rej, kjer so v preteklosti že imeli izbruhe edemske bolezni; (N+) pomeni pozitivne reje, kjer v preteklosti še niso imeli izbruhov edemske bolezni; (N) pomeni vse reje, kjer v preteklosti še niso imeli izbruhov edemske bolezni.

Legend for the table 7: (P+) means the number of positive farms that had outbreaks of edema disease in the past; (P) means the total number of farms that had outbreaks of edema disease in the past; (N+) means the number of farms that had outbreaks of edema disease in the past; (N) means total number of farms that had outbreaks of edema disease in the past.

#### 4.3.6 Prevalenca glede na starost prašičev

Uporabili smo 31 rezultatov iz prve starostne skupine tekačev, 32 rezultatov iz druge starostne skupine tekačev, 28 rezultatov iz tretje starostne skupine pitancev in 27 rezultatov iz četrte starostne skupine pitancev. Za noben primerjan par starostnih skupin nismo našli statistično značilne razlike v prevalenci in ne moremo trditi, da se edemska bolezen pogosteje pojavlja v

kateri izmed štirih raziskovanih starostnih kategorij v primerjavi z drugimi. Hipoteza je bila preverjena z vsemi tremi statističnimi testi: Fisherjev test, test enakih deležev in Wilcoxonov test. Rezultati statistične primerjave parov starostnih skupin tekačev in pitancev so prikazane v Tabeli 8.

Tabela 8: Primerjava prevalece edemske bolezni med starostnimi skupinami prašičev/ Table 8: Comparison of the prevalence of edema disease among the age groups of pigs

| <b>Starostne skupine prašičev</b> | <b>Fisherjev natančni test (p-vrednost)</b> | <b>Test enakih deležev (p-vrednost)</b> | <b>Wilcoxonov test (p-vrednost)</b> |
|-----------------------------------|---|---|-------------------------------------|
| <b>5–6 tednov in 7–8 tednov</b>   | 0.6088432                                   | 0.6592330                               | 0.5111830                           |
| <b>5–6 tednov in 12 tednov</b>    | 0.1957754                                   | 0.3844993                               | 0.1686092                           |
| <b>5–6 tednov in 14 tednov</b>    | 0.2889572                                   | 0.4296001                               | 0.2165980                           |
| <b>7–8 tednov in 12 tednov</b>    | 0.6050609                                   | 0.6545164                               | 0.4565256                           |
| <b>7–8 tednov in 14 tednov</b>    | 0.6059726                                   | 0.7114586                               | 0.5439829                           |
| <b>12 tednov in 14 tednov</b>     | 1.0000000                                   | 0.9433563                               | 0.9070209                           |

## 5 RAZPRAVA

Z raziskovalno nalogo smo želeli ugotoviti prevalenco edemske bolezni v slovenskih komercialnih rejah prašičev in odvisnost pojavljanja bolezni od tehnologije reje ter izvajanja biovarnostnih ukrepov. Vzorčili smo 37 komercialnih rej prašičev, ki so imele vsaj 20 plemenskih svinj. Malo slovenskih rej dosega ta kriterij, hkrati pa se nahajajo predvsem v prekmurski in štajerski statistični regiji, zato je bil vzorec majhen in je obsegal reje prašičev, ki so si geografsko precej blizu.

Prevalenca edemske bolezni v Sloveniji je 64,9 % in višja od prevalece, izračunane v nemških rejah prašičev, kjer pri tekačih poročajo o 53,5 % prevalenci patotipa STEC, ki izloča STx2e (Berger in sod., 2023). Nekoliko višja prevalenca v Sloveniji je najverjetneje posledica dejstva, da rejci prašičev ne posumijo, da imajo v reji prisotnega povzročitelja edemske bolezni, ker bolezen lahko poteka subklinično, in svoje črede posledično ne cepijo proti patotipu EDEC (25 rejcev od 33 vprašanih ne cepi). Poleg tega veliko rejcev prašičev, vključenih v študijo, ne izvaja nikakršnega preventivnega cepljenja proti boleznim prašičev (8 od 33 vprašanih ne cepi proti nobeni bolezni). Zaznali smo slabo znanje in izvajanje ukrepov zunanje in notranje biovarnosti, vključno z izvajanjem karantene (karanteno izvaja 24 od 33 vprašanih rejcev), pranjem in razkuževanjem brejih svinj, preden se jih prestavi v prasiatveni boks (17 rejcev od 33 vprašanih vsaj opere ali razkuži svinje, preden se jih prestavi v prasiatveni boks), ter odsotnost čiščenja vodovodnih sistemov v reji (vodovodni sistem čisti 10 od 33 vprašanih rejcev). Vsi anketirani rejci očistijo prasiatvene bokse pred naselitvijo breje svinje, a to ni dovolj za preprečitev prenosa patogenih mikrobov s svinje na pujske, če ne operejo in razkužijo tudi breje svinje. Trije rejci od 33 vprašanih ne očistijo boksov, preden vanje naselijo nov turnus tekačev. Od 30 rejcev, ki bokse za tekače očistijo in razkužijo, jih 13 uporablja samo Ekocid®, 2 rejca kombinirata Ekocid® in Virocid®, 5 rejcev uporablja samo Virocid®, 2 rejca uporabljata glutraldehid in aktivno klorovo peno za čiščenje, 1 rejec uporablja Agacid, 1 rejec uporablja razkužila proizvajalca Cid Lines in 1 rejec razkužila proizvajalca Biomin, 4 rejci pri čiščenju uporabijo samo vodo. Znano je, da imajo sevi *E. coli* sposobnost tvorbe biofilmov. Na uspešnost razkužil proti biofilmom vplivajo starost biofilma, kontaktni čas in sestava razkužila. Proti *E. coli* delujeta najboljše VirkonS in Virocid (Osland in sod., 2020) oziroma razkužila, ki vsebujejo glutraldehid in kvartarne amonijeve spojine ter klorokresol (Montagnin in sod., 2022). K višji prevalenci edemske bolezni prispeva tudi velik delež rejcev, ki iz lastnih poljščin ob dodatku komercialnih vitaminsko-mineralnih premiksov pripravijo krmni obrok tekačev, ne da bi poznali natančno sestavo in kakovost krme (4 rejci od 14 vprašanih rejcev, ki sami pripravljajo krmni obrok, poznajo sestavo obroka). Prehrana je namreč pomemben dejavnik, ki lahko s sestavo obroka in pogostostjo hranjenja vpliva na prevalenco edemske bolezni (Neumann in sod., 2020). Pomemben potencialen vir za vnos povzročitelja je tudi podatek, da vsi rejci razen enega kupujejo prašiče (večinoma breje ali nebreje mladice) iz tujine brez poznanega zdravstvenega statusa.

V nemški raziskavi so vzorčili samo prašiče v starosti 5–8 tednov (Berger in sod., 2023), mi pa smo vzorčili tudi tekače oziroma pitance v fazi predpitanja, stare 12 in 14 tednov. Samo v štirih od sedemintridesetih vzorčenih rej je bil verotoksin prisoten pri tretji in četrti starostni kategoriji, ne pa tudi v prvi in drugi, zato menimo, da so rezultati obeh raziskav primerljivi. Poleg tega je vzorčenje ustne tekočine neinvazivna metoda, ki je preprosta za uporabo in vodi do zanesljivih diagnostičnih rezultatov, zato bi lahko bila v prihodnje zanimiva za rejce, ki bi se pogosteje odločali za testiranje črede. To bi omogočilo hitrejšo diagnostiko (subkliničnih) bolezni in hitrejša ukrepanja, posledično pa manjše izgube v rejah prašičev. Poleg prevalece sevov *E. coli*, ki izločajo verotoksin Stx2e, so v Nemčiji preverjali tudi prisotnost patotipa EDEC in določili prevalenco 37,4 %, kar nakazuje na pomemben delež primerov edemske bolezni, povzročene z drugimi patotipi *E. coli* kot z EDEC, ki zaradi prenosa virulentnih faktorjev med patotipi tudi izločajo toksin Stx2e in povzročajo enako klinično sliko kot z EDEC povzročena edemska bolezen (Kaper in sod., 2004; Taylor, 2013). Zanimive bi bile nadaljnje raziskave istih slovenskih rej, da bi določili prevalenco EDEC patotipa v primerjavi z ostalimi patotipi, ki morda tudi izločajo toksin Stx2e.

Dokazali smo statistično značilno razliko v prisotnosti verotoksina v ustni tekočini odstavljenecv med rejami, kjer so vse kategorije prašičev izključno vhlavljenecv, in rejami, kjer ima vsaj ena izmed kategorij možnost izpusta. Glede na statistično obdelavo rezultatov je bila prevalenca *E. coli* v izključno hlevskih rejah bistveno večja od prevalece v rejah, kjer je imela vsaj ena izmed kategorij možnost izpusta, zato smo hipotezo, da imajo hlevske reje nižjo prevalenco v primerjavi z rejami z izpustom, ovrgli. Razpoke v tleh in stenah dotrajanih ter slabo vzdrževanih boksov služijo kot odličen substrat za nastanek biofilmov, ki jih sevi *E. coli* dokazano tvorijo. Z naraščajočo starostjo bakterijskih biofilmov se povečuje tudi težavnost njihove uspešne odstranitve (Osland in sod., 2020). Glede na to, da 4 rejci od 33 vprašanih bokse pred vselitvijo tekačev očistijo le z vodo, 3 rejci pa jih pred menjavo turnusov sploh ne očistijo, obstaja velika verjetnost, da so biofilmi v teh rejah prisotni že dolgo, zato so visoko odporni na mehansko čiščenje in predstavljajo vir okužbe za tekače. Pomanjkljivo čiščenje brez razkuževanja jih ne more odstraniti, zato se povzročitelj edemske bolezni v takšnih rejah ohranja. V 16 rejah, kjer so prasitveni boksi pred vselitvijo očiščeni in razkuženi, sama svinja pa ne, se sicer čisti prasitveni boksi lahko naknadno kontaminirajo z vselitvijo neočiščene in nerazkužene svinje. 23 rejcev od 33 vprašanih nikoli ne očisti vodovodnih sistemov, ki so zaradi visoke vlage in nizke temperature potencialno okolje za tvorbo odpornih bakterijskih biofilmov

(Fairbrother in Nadeau, 2019). Glede na nizko prevalenco povzročitelja v rejah z izpustom je okužba prašičev ob stiku z drugimi živalskimi vrstami ali posredno s kontaminirano krmo ali vodo, s katero so bile druge živalske vrste v stiku, v slovenskem prostoru malo verjetna.

Dokazali smo tudi statistično značilno razliko v prisotnosti verotoksina v ustni tekočini tekačev in pitancev med rejami, kjer tekače krmijo s komercialno krmo, in rejami, kjer krmo mešajo sami, ter doma pridelanim žitaricam in stročnicam dodajajo le komercialne mineralno-vitaminske premikse. Tako smo potrdili hipotezo o višji prevalenci edemske bolezni v rejah, kjer krmo pripravljajo sami, v primerjavi z rejami, kjer krmo kupujejo. Deset rejcev od skupno štirinajstih, ki krmo mešajo sami, ne pozna točne sestave krme, polovica vprašanih rejcev, ki pripravljajo svojo krmo, pa ne tehta prašičev, zato nimajo realnega vpogleda v kakovost in ustreznost krme, ki jo pripravijo. V izogib pojavu klinične in subklinične edemske bolezni je pomemben nadzor nad sestavo krme in količino hranilnih snovi v krmi, predvsem beljakovin, ki so vir toksičnih presnovnih produktov (Fairbrother in Nadeau, 2019; Neumann in sod., 2020), zato bi morali rejci v pregled sestave krme in hranilne vrednosti pošiljati vzorce krme pred začetkom pokladanja prašičem. Poznavanje sestave premiksov, ki jih rejci dodajajo doma pripravljenem krmnem obroku z neznano sestavo, ni dovolj za oceno ustreznosti sestave celotnega obroka. Velik delež tekačev ima na voljo krmo *ad libitum* (27 rejcev od 33 vprašanih), kar tudi prispeva k pogostejši prevalenci edemske bolezni (Fairbrother in Nadeau, 2019), hkrati pa prispeva k manjši higieni boksov in še posebej pri rejcih, ki uporabljajo mokro krmo, predvsem v poletnih mesecih vodi v hitrejše kvarjenje krme.

Samo 6 od 33 vprašanih rejcev dodaja v krmo ali vodo poleg vitaminsko-mineralnih dodatkov tudi eterična olja, probiotike ali organske kisline. Trije rejci uporabljajo probiotike in organske kisline, en rejec samo organske kisline, dva rejca pa organske kisline, probiotike in eterična olja origana, poprove mete in komarčka. Prašiči z dostopom do kislinskih dodatkov in eteričnih olj v obroku so bolj priraščali z manjšo prevalenco enterotoksemije zaradi okužb z *E. coli*, zabeležene pa so tudi koristi uporabe probiotikov v krmnem obroku (Fairbrother in Nadeau, 2019; Pejsak in sod., 2023).

Velikost reje, starostna kategorija tekačev in pitancev, prisotnost karantene in obolevnost prašičev z edemsko boleznijo v preteklosti so dejavniki, ki na prevalenco niso imeli statistično značilnega vpliva. Manjši pomen velikosti reje na prevalenco edemske bolezni je najverjetneje

posledica velikih razlik med rejci glede znanja o nalezljivih boleznih prašičev in izvajanju biovarnostnih ukrepov v rejah.

Nasploh je upoštevanje ukrepov zunanje in notranje biovarnosti, kot so ločevanje posameznih kategorij prašičev po prostorih (27 rejcev od 33 vprašanih ima prašiče različnih kategorij ločene po prostorih), uvedba proizvodnega ritma (29 rejcev od 33 vprašanih ima uveden proizvodni ritem), uvedba sistema vse noter-vse ven (23 rejcev od 33 vprašanih ima uveden sistem vse noter-vse ven), kupovanje prašičev z znanim zdravstvenim statusom (30 rejcev od vprašanih kupuje prašiče iz virov, ki jamčijo za zdravstveni status prašičev), pranje in razkuževanje svinj pred premikom v prasilišče (17 rejcev od 33 vprašanih vsaj opere ali razkuži brejo svinjo pred predstavitvijo v prasiatveni boks) ter preventivno cepljenje proti najpogostejšim boleznim prašičev še vedno precej različno zastopano med različnimi rejami, kar zagotovo bolj vpliva na pojavnost bolezni kot sama velikost reje.

Od 33 vprašanih rejcev jih 17 cepi zoper mikoplazemsko pljučnico, 2 rejca zoper atrofični rinitis, 11 rejcev zoper parvovirusne okužbe, 7 rejcev zoper rdečico, 11 rejcev zoper circoviruse tipa 2, 8 rejcev zoper edemsko bolezen, 2 rejca zoper PRRS (ang. porcine reproductive and respiratory syndrome), 5 rejcev zoper klostridijske okužbe in 1 rejec zoper Glässerjevo bolezen. Reje smo sicer razdelili na velike in majhne z mejo 500 prašičev, a so vse zelo majhne v primerjavi z rejami v tujini. Največja reja ima stalež 17.500 prašičev, najmanjša pa 121 prašičev. Slovenski rejci prašičev se še vedno redko odločajo za ugotavljanje zdravstvenega stanja v svojih čredah, zato ne poznajo dobro zdravstvenega statusa črede in ne cepijo prašičev. Še posebej je to problematično pri boleznih, ki se pojavljajo v subklinični obliki, kot je edemska bolezen v rejah, ki so bile predmet proučevanja.

Edemska bolezen naj bi se pogosteje pojavljala neposredno po odstavitvi kot nekaj tednov po njej (Fairbrother in Nadeau, 2019), a v naši raziskavi nismo ugotovili statistično značilne povezave med starostno skupino tekačev in prevalenco edemske bolezni. Toksin Stx2e ni bil statistično značilno pogosteje odkrit pri tekačih iz prve in druge starostne skupine v primerjavi s pitanci iz tretje in četrte starostne skupine, kar morda prikazuje na stalno prisotnost povzročitelja v reji ne glede na starost prašičev. Hipoteze o višji prevalenci edemske bolezni pri 5–6 tednov starih tekačih in 7–8 tednov starih tekačih v primerjavi s pitanci v starosti 12 in 14 tednov nismo potrdili.

## 6 SKLEPI

- V Sloveniji je 64,9 % prevalenca edemske bolezni, povzročena s sevi *E. coli*, ki izločajo toksin Stx2e,
- Hlevska reja brez izpusta in krmljenje z lastno krmo sta dejavnika, ki statistično značilno povečata možnost za nastanek edemske bolezni,
- Velikost reje, uvedena karantena za kupljene prašiče in prisotnost edemske bolezni v preteklosti so dejavniki, ki niso statistično značilno povezani s prevalenco edemske bolezni,
- Edemska bolezen ni statistično značilno pogosteje prisotna v starosti 5–8 tednov v primerjavi s starejšimi tekači in pitanci,
- Znanje rejcev o edemski bolezni in njeni preventivi je v Sloveniji slabo, zato bo treba rejce izobraziti na tem področju.

## 7 POVZETEK

Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti prevalenco edemske bolezni pri tekačih in pitancih v komercialnih rejah z vsaj 20 plemenskimi svinjami v Sloveniji. Vzorcev ustne tekočine so bili pridobljeni z uporabo neinvazivne metode vzorčenja z bombažnimi vrvmi v 37 rejah v štajerski, prekmurski in dolenski statistični regiji. Izvedli smo RT-PCR fluorescenčni test s 5' nukleazno aktivnostjo DNA polimeraze. Rezultate RT-PCR testa smo primerjali z odgovori anketnih vprašalnikov, ki smo jih izpolnili v rejah, in statistično obdelali s Fisherjevim natančnim testom, testom enakih deležev in Wilcoxonovim testom. Ugotovili smo 64,9 % prevalenco edemske bolezni, povzročene s sevi, ki izločajo toksin Stx2e, in statistično značilno povezavo med višjo prevalenco bolezni v hlevskih rejah brez izpusta, in rejami, kjer rejci sami mešajo krmo za tekače in pitance. Velikost reje, izvajanje karantene za kupljene prašiče in prisotnost edemske bolezni v preteklosti niso statistično značilno povezane s prevalenco edemske bolezni, hkrati pa se bolezen ne pojavlja statistično značilno pogosteje pri 5–6 in 7–8 tednov starih tekačih v primerjavi z 12 in 14 tednov starimi pitanci.

## 8 ZAHVALE

Najlepša hvala mentorici izr. prof. dr. Marini Štukelj za strokovno pomoč pri pisanju te raziskovalne naloge in pri organizaciji vzorčenj med rejci, veterinarji, fakulteto in podjetjem Animalis.

Iskreno se zahvaljujem asist. dr. Timu Šteferlu in kolegu Matevžu Pušniku za pomoč pri vzorčenju.

Najlepša hvala podjetju Animalis za sponzorstvo vzorčnega materiala, še posebej Angelci Križnar in Staši Trobiš, ki sta nas spremljali in pomagali pri vzorčenju.

Hvala podjetju Hipra za hitro in zanesljivo diagnostiko edemske bolezni ter pomoč pri razumevanju principa diagnostike s fluorescenčno RT-PCR.

Zahvaljujem se vsem veterinarjem, ki so priporočili reje za obisk, ter vsem rejcem prašičev, ki so nam omogočili vstop v reje in si vzeli čas za izpolnitev vprašalnika.

Za izvedbo statistične analize in nasvete pri njeni interpretaciji se iskreno zahvaljujem doc. ddr. Meliti Hajdinjak, prof. mat.

Za lektoriranje raziskovalne naloge se iskreno zahvaljujem Klari Tominšek.

## **9 LITERATURA**

1. Baek KH, Tangchang W, Choi EJ, et. al. Experimental infection of post-weaned pigs with F18-encoding enterotoxigenic and enterotoxigenic/shigatoxigenic *Escherichia coli* strain isolated from the diarrheic feces in Korea. *Open Vet J.* 2023; 13(6): 705–14.

doi: 10.5455/OVJ.2023.v13.i6.5

2. Bao WB, Ye L, Pan ZY, et al. The effect of mutation at M307 in FUT1 gene on susceptibility of *Escherichia coli* F18 and gene expression in Sutai piglets. *Mol Biol Rep* 2012; 39(3): 3131–6.

doi: 10.1007/s11033-011-1078-6

3. Barth SA, Bauerfeind R, Berens C, Menge C. Shiga Toxin-Producing *E. coli* in Animals: Detection, Characterization, and Virulence Assessment. *Methods Mol Biol* 2021; 2291: 19–86.

doi: 10.1007/978-1-0716-1339-9\_2

4. Berger PI, Hermanns S, Kerner K, et al. Cross-sectional study: prevalence of oedema disease *Escherichia coli* (EDEC) in weaned piglets in Germany at pen and farm levels. *Porcine Health Manag* 2023; 9(1): 49.  
doi: 10.1186/s40813-023-00343-9
5. Byun JW, Moon BY, Do KH, et al. O-Serogroups and Pathovirotypes of *Escherichia coli* Isolated from Post-Weaning Piglets Showing Diarrhoea and/or Oedema in South Korea. *Vet Sci* 2021; 9(1): 1.  
doi: 10.3390/vetsci9010001
6. Casanova NA, Redondo LM, Dailoff GC, Arenas D, Fernández Miyakawa ME. Overview of the role of Shiga toxins in porcine edema disease pathogenesis. *Toxicon* 2018; 148: 149–54.  
doi: 10.1016/j.toxicon.2018.04.019
7. Charbonneau ME, Mourez M. The *Escherichia coli* AIDA-I autotransporter undergoes cytoplasmic glycosylation independently of export. *Res Microbiol* 2008; 159(7-8): 537–44.  
doi: 10.1016/j.resmic.2008.06.009
8. Charerntantanakul W. Adjuvants for swine vaccines: Mechanisms of actions and adjuvant effects. *Vaccine* 2020; 38(43): 6659–81.  
doi: 10.1016/j.vaccine.2020.08.054
9. Coddens A, Diswall M, Angström J, et al. Recognition of blood group ABH type 1 determinants by the FedF adhesin of F18-fimbriated *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2009; 284(15): 9713–26.  
doi: 10.1074/jbc.M807866200
10. Conway E, Sweeney T, Dowley A, et al. The effects of mushroom powder and vitamin D2-enriched mushroom powder supplementation on the growth performance and health of newly weaned pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2022; 106(3): 517–27.  
doi: 10.1111/jpn.13614
11. Cornick NA, Matisse I, Samuel JE, Bosworth BT, Moon HW. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: temporal and quantitative relationships among colonization, toxin production, and systemic disease. *J Infect Dis* 2000; 181(1): 242–51.  
doi: 10.1086/315172

12. Do KH, Seo KW, Byun JW, Lee WK. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance genes of pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic weaned piglets. *Res Vet Sci* 2022; 150: 137–43.  
doi: 10.1016/j.rvsc.2022.05.007
13. Edema disease. In: Neumann EJ, eds. *Swine disease manual*. 5th ed. Perry Iowa: American association of Swine Veterinarians, 2020.  
<https://vetmed.iastate.edu/vdpam/FSVD/swine/index-diseases/edema-disease> (3. 6. 2024)
14. Fairbrother JM in Nadeau E. Colibacillosis. In: Zimmerman JJ, eds. *Diseases of Swine*. 11th ed. Hoboken: Wiley, 2019: 807–34.
15. Frydendahl K, Imberechts H, Lehmann S. Automated 5' nuclease assay for detection of virulence factors in porcine *Escherichia coli*. *Mol Cell Probes*. 2001; 15(3): 151–60.  
doi: 10.1006/mcpr.2001.0354
16. Leneveu P, Collet J, Sévin J, et al. Investigation of subacute edema disease in France. Impact on swine performance. In: 11th European symposium of porcine health management: Abstract book, Utrecht: European College of Porcine Health Management, 2019: 201.
17. Luppi A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Manag* 2017; 3: 16.  
doi: 10.1186/s40813-017-0063-4
18. Kanengoni AT, Thomas R, Gelaw AK, Madoroba E. Epidemiology and characterization of *Escherichia coli* outbreak on a pig farm in South Africa. *FEMS Microbiol Lett* 2017; 364(3).  
doi: 10.1093/femsle/fnx010
19. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2(2): 123–40.  
doi: 10.1038/nrmicro818
20. Maertens H, Van Coillie E, Millet S, et al. Repeated disinfectant use in broiler houses and pig nursery units does not affect disinfectant and antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* field isolates. *BMC Vet Res* 2020; 16(1): 140.  
doi: 10.1186/s12917-020-02342-2

21. Matise I, Cornick NA, Samuel JE, Moon HW. Binding of shiga toxin 2e to porcine erythrocytes in vivo and in vitro. *Infect Immun* 2003; 71(9): 5194–201.  
doi: 10.1128/IAI.71.9.5194-5201.2003
22. Matise I, Sirinarumitr T, Bosworth BT, Moon HW. Vascular ultrastructure and DNA fragmentation in swine infected with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Vet Pathol* 2000; 37(4): 318–27.  
doi: 10.1354/vp.37-4-318
23. Miller AD, Porter BF. Nervous system. In: Zachary JF, ed. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 7th ed. St. Louis: Elsevier; 2021: 362.
24. Montagnin C, Cawthraw S, Ring I, et al. Efficacy of Five Disinfectant Products Commonly Used in Pig Herds against a Panel of Bacteria Sensitive and Resistant to Selected Antimicrobials. *Animals* 2022; 12(20): 2780.  
doi: 10.3390/ani12202780
25. Nguyen UV, Coddens A, Melkebeek V, et al. High susceptibility prevalence for F4+ and F18+ *Escherichia coli* in Flemish pigs. *Vet Microbiol* 2017; 202: 52–7.  
doi: 10.1016/j.vetmic.2016.01.014
26. Oanh TK, Nguyen VK, De Greve H, Goddeeris BM. Protection of piglets against Edema disease by maternal immunization with Stx2e toxoid. *Infect Immun* 2012; 80(1): 469–73.  
doi: 10.1128/IAI.05539-11
27. Osland AM, Vestby LK, Nesse LL. The Effect of Disinfectants on Quinolone Resistant *E. coli* (QREC) in Biofilm. *Microorganisms* 2020; 8(11): 1831.  
doi: 10.3390/microorganisms8111831
28. Pejsak Z, Kaźmierczak P, Butkiewicz AF, Wojciechowski J, Woźniakowski G. Alternatives to zinc oxide in pig production. *Pol J Vet Sci* 2023; 26(2): 319–30.  
doi: 10.24425/pjvs.2023.145033
29. Petit G, Grosbois V, Chalvet-Monfray K, et al. Polymorphism of the alpha-1-fucosyltransferase (FUT1) gene in several wild boar (*Sus scrofa*) populations in France and link to edema disease. *Res Vet Sci* 2020; 131: 78–86.

doi: 10.1016/j.rvsc.2020.03.025

30. Petrovsky N, Cooper PD. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2011; 10(4): 523–37.

doi: 10.1586/erv.11.30

31. Piñeyro P. Vaccination strategies for the prevention of oedema disease and diarrhoea caused by *E.coli*. Oedema disease (1/2). Lagos: Professional Pig Community, 2016.

<https://www.pig333.com/articles/vaccination-strategies-for-the-prevention-of-oedema-disease-11689/> (30. 5. 2024)

32. Pokharel P, Dhakal S, Dozois CM. The Diversity of *Escherichia coli* Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. *Microorganisms* 2023; 11(2): 344.

doi: 10.3390/microorganisms11020344

33. Prager R, Bauerfeind R, Tietze E, Behrend J, Fruth A, Tschäpe H. Prevalence and deletion types of the pathogenicity island ETT2 among *Escherichia coli* strains from oedema disease and colibacillosis in pigs. *Vet Microbiol* 2004; 99(3-4): 287–94.

doi: 10.1016/j.vetmic.2004.01.011

34. Ramos S, Silva V, Dapkevicius MLE, et al. *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria Among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) Production. *Animals (Basel)*. 2020; 10(12): 2239.

doi: 10.3390/ani10122239

35. ECL. Reference Laboratory for *Escherichia coli* (ECL). Montreal: Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 2004. <http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/index.asp> (25. maj 2024)

36. Schierack P, Weinreich J, Ewers C, Tachu B, Nicholson B, Barth S. Hemolytic porcine intestinal *Escherichia coli* without virulence-associated genes typical of intestinal pathogenic *E. coli*. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(23): 8451–5.

doi: 10.1128/AEM.05289-11

37. Taylor DJ. Pig diseases. 9th ed. Hitchin: Wayment Print & Publishing Solutions Ltd, 2013: 154–8.

38. Tseng M, Fratamico PM, Bagi L, Manzinger D in Funk JA. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in swine: prevalence over the finishing period and characteristics of the STEC isolates. *Epidemiology & Infection* 2015; 143(3): 505–14.  
doi: 10.1017/S0950268814001095

39. Verdonck F, Cox E, Ampe B, Goddeeris BM. Open status of pig-breeding farms is associated with slightly higher seroprevalence of F18+ *Escherichia coli* in northern Belgium. *Prev Vet Med* 2003; 60(2): 133–41.  
doi: 10.1016/s0167-5877(03)00121-1

40. Yoshimura M, Honda Y, Yonemitsu E, Takahashi R, Suenaga K, Waki T. Induction of antitoxic antibody and preventive effect against porcine edema disease by the pentameric Stx2eB subunit vaccine. *Vet Res* 2023; 54(1): 29.  
doi: 10.1186/s13567-023-01161-1

## **10 PRILOGE**

Priloga 1: Vprašalnik o edemski bolezni

Kraj (naslov) in datum: \_\_\_\_\_

## NEONATALNE DRISKE IN EDEMSKA BOLEZEN – ANKETA

### Splošni podatki o reji

1. Vrsta reje (hlevska/izpust...) \_\_\_\_\_

2. Koliko je vseh prašičev v reji? \_\_\_\_\_

3. Koliko plemenskih svinj je v reji? \_\_\_\_\_

4. Koliko pitancev je v reji? \_\_\_\_\_

5. Kolikšen je odstotek pogina v

A. prasilišču

B. vzrejališču

C. pitališču

6. Kolikšno je število živorojenih pujskov na gnezdo? \_\_\_\_\_

7. Kolikšno je število odstavljenih pujskov na gnezdo? \_\_\_\_\_

8. Kolikšni so prirasti v

A. prasilišču

B. vzrejališču

C. pitališču

9. Uporabljate

- naravni pripust
- semenitev
- oboje

10. Kolikšno je število gnezd na leto na svinjo? \_\_\_\_\_

**Biovarnost**

1. Ali je reja ograjena?

A. Da

B. Ne

2. Ali se pred vstopom v rejo vedno preoblečete in preobujete?

A. Da

B. Ne

3. Ali dovolite obiskovalcem vstop v rejo?

A. Da

B. Ne

4. Če da, ali se ti vedno preoblečejo in preobujejo (velja tudi za veterinarja)?

A. Da

B. Ne

5. Ali je ob vstopu na posest nameščena dezinfekcijska bariera in če da, kakšne vrste (npr. šobe, kanal z razkužilom...)?

A. Da

B. Ne

---

6. Ali so pred vhodom v posamezne objekte in sobe nameščene dezinfekcijske bariere?

A. Da

B. Ne

7. Kako pogosto menjate razkužilo v dezinfekcijski barieri?

A. Vsak dan

B. Vsak drugi dan

C. Vsak teden

D. Drugo \_\_\_\_\_

8. Ali so kategorije prašičev ločene po prostorih?

A. Da

B. Ne

9. Ali je uveden proizvodni ritem?

A. Da

B. Ne

10. Ali se izvaja sistem reje vse noter/vse ven?

A. Da

B. Ne

11. Ali ima katera izmed kategorij izpust?

A. Da

B. Ne

12. Ali imajo prašiči, ki jih uvajate v rejo, poznan zdravstveni status?

A. Da

B. Ne

13. Imate za novoprispele živali urejeno karanteno ter kje so nastanjene in kako dolgo?

A. Da

B. Ne

14. Ali ima reja bolnišnične bokse?

A. Da

B. Ne

15. Kako pogosto se izvajata dezinfekcija in deratizacija?

16. Kako pogosto očistite in razkužite vodovodne sisteme v reji?

17. Kako je shranjena krma in kako je zaščitena pred okoljem in drugimi živalmi?

18. Kakšen je sistem odstranjevanja gnoja in gnojevke v reji, kje se shranjujejo ter kako pogosto se čisti bokse?

19. Ali ima oseba, ki dela v prasilišču predhodno stik z drugimi kategorijami prašičev ali hodi v drug hlev?

A. Da

B. Ne

### **Reja in prehrana v vzrejališču**

1. Kolikšna je temperatura v pitališču? \_\_\_\_\_

2. Ali krmite prašiče po volji (ad libitum)?

A. Da

B. Ne

3. V koliko dneh po odstavitvi preidejo prašiči na novo krmo? \_\_\_\_\_

4. Ali krmite s komercialno krmo?

A. Da

B. Ne

5. Kakšna je sestava krme tekačev? Beljakovine (%) \_\_\_\_\_, vlaknine (%) \_\_\_\_\_, metionin (%) \_\_\_\_\_, lizin (%) \_\_\_\_\_.

6. Ali imajo tekači na voljo vodo z dodatkom organskih kislin?

A. Da

B. Ne

7. Če da, katere kisline uporabljate in kakšen je ciljni pH vode?

8. Ali v reji uporabljate probiotike?

A. Da

B. Ne

9. Če da, katere probiotike uporabljate? \_\_\_\_\_

10. Ali v reji uporabljate eterična olja?

A. Da

B. Ne

11. Če da, katera eterična olja uporabljate? \_\_\_\_\_

12. Ali v reji uporabljate mineralno-vitaminske dodatke?

A. Da

B. Ne

13. Če da, katere mineralno-vitaminske dodatke uporabljate? \_\_\_\_\_

### **Zdravstveno varstvo**

1. Ali imate v reji zdravstvene težave? Če da, dopišite kategorijo prašičev, klinično sliko in kako pogosto se zdravstvene težave pojavljajo. Da/ne

2. Ali so bili prašiči v zadnjem tednu zdravljeni ali preventivno krmljeni z antibiotiki? Če da, dopišite kategorijo prašičev, aktivno učinkovino, odmerek in način aplikacije. Da/ne

3. S katerimi pripravki (aktivna učinkovina in odmerek) ste očistili in razkužili bokse pred vselitvijo odstavljenecv?

4. Katera preventivna cepljenja izvajate v reji in pri katerih kategorijah?

### **E. coli**

1. Ali ste v preteklosti imeli izbruhe edemske bolezni?

A. Da

B. Ne

2. Kateri od naslednjih kliničnih znakov so se pojavili v reji ob izbruhu? Nenaden pogin (da/ne), živčni znaki (da/ne), edem vek in čela (da/ne), znaki okužbe dihal (da/ne), drugo

3. Ali ste pujske cepili proti STEC?

A. Da

B. Ne