

Longitudinale veldstudie om het belang van rotavirus infecties bij jonge biggen in Vlaanderen te situeren

bachelor in de agro- en biotechnologie
afstudeerrichting dierenzorg
bachelorproef



van der Hallen Eleni
Academiejaar 2015-2016/ 4BD AO
Begeleidende lector: Dr. Ir. Merijn Vanhee
Stagementor: Dr. Sebastiaan Theuns



UGent-Faculteit Diergeneeskunde
Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie
Salisburylaan 133
9820 Merelbeke
www.ugent.be

Woord vooraf

Mijn fascinatie voor het wetenschappelijk onderzoek werd versterkt dankzij mijn vorige stage in het Expertisecentrum agro- en biotechnologie aan de Vives Hogeschool in Roeselare. Na afloop van deze stage besloot ik om mij voor mijn laatste stage en eindwerk verder onder te dompelen in het onderzoek. Dr. ir. M. Vanhee bracht mij in contact met het laboratorium voor Virologie aan de Faculteit Diergeneeskunde (UGent), waar een IWT LA traject opgestart werd. Mijn taak in dit project bestond eruit om rotavirus infecties bij jonge biggen op Vlaamse varkensbedrijven verder in kaart te brengen.

Met dit eindwerk heb ik getracht een duidelijk beeld te scheppen rond de rotavirus problematiek bij varkens. De literatuurstudie biedt een inzicht in de viruskarakteristieken, de epidemiologie, replicatiecyclus en klinische symptomen bij varkens. Het onderdeel materiaal en methoden bespreekt de gebruikte onderzoekstechnieken in deze studie. In een volgend deel worden de bekomen resultaten van het onderzoek weergegeven. Tot slot bieden de discussie en het algemeen besluit een korte omschrijving van mijn bevindingen met resultaten van eerder uitgevoerde studies omtrent dit onderwerp.

Tenslotte wil ik een aantal mensen bedanken zonder wie mijn stage en eindwerk niet tot stand zou zijn gekomen. Dit is in het bijzonder mijn stagementor Dr. Sebastiaan Theuns die mij met veel enthousiasme inleidde in de fascinerende rotawereld en zorgde voor een uitstekende begeleiding, ook bij de verbetering van dit eindwerk. Prof. Dr. Hans Nauwynck wil ik bedanken voor de aangeboden kans om mee te werken aan dit project en de ondersteuning. Verder bedank ik Dr. Ir. Merijn Vanhee als begeleidende lector voor het voorstellen van deze stageplaats en het verbeteren van mijn eindwerk. Laborante Ytse Noppe wil ik bedanken voor de begeleiding in het labo en het in goede banen leiden van de uitgevoerde experimenten. Doctoraatstudenten Wendy Baetens, Sebastiaan Van Bockstael, Gaëtan De Gryse, Inge Roukaerts, Isaura Christiaens, Delphine Acar, Kasper Meyntjens en Tingting Cui bedank ik voor de aangename werksfeer en aangeboden hulp. Ook Dr. Lowiese Desmarets stond steeds klaar om nodige vragen te beantwoorden en raad te geven. Bovendien wil ik alle medewerkers van het laboratorium Virologie bedanken voor hun hulpvaardigheid en om mij wegwijs te maken in het labo. Doctoraatstudent Caroline Bonckaert ben ik dankbaar voor de uitstekende begeleiding bij de varkens, zij heeft mij ontzettend veel bijgeleerd. Tot slot bedank ik mijn familie, vrienden en vriend voor het nodige begrip en de steun tijdens het maken van dit eindwerk.

Eleni van der Hallen
Mei 2016

GEINTEGREERD EINDWERK

Titel

Longitudinale veldstudie om het belang van rotavirus infecties bij jonge biggen in Vlaanderen te situeren

Abstract

Bij jonge biggen in de kraamstal en biggenbatterij vormt diarree een belangrijk gezondheidsprobleem. De betrokkenheid van rotavirussen in de pathogenese ervan werd de laatste jaren slechts beperkt onderzocht. Een longitudinale veldstudie vormt het eerste werkpakket van een 4-jaar durend IWT-LA project, waarbij de klinische en economische impact van rotavirussen op Vlaamse varkensbedrijven zal bepaald worden¹.

In het kader van dit eindwerk werden er 2 Vlaamse varkensbedrijven onderworpen aan een longitudinale veldstudie. Geselecteerde biggen werden in een eerste bedrijf opgevolgd vanaf de geboorte tot aan het spenen en in een tweede bedrijf vanaf het spenen tot aan het einde van de batterijfase om de uitscheiding van groep A en C rotavirussen in kaart te brengen met behulp van RT-qPCR en stamtypering. Ook de eventuele impact op de groei van de biggen wordt onderzocht. De resultaten tonen aan dat 15 van de 19 opgevolgde biggen op een gegeven moment geïnfecteerd geraken met groep A en/of C rotavirussen.

Met de bekomen resultaten zal een gerichte diagnostische strategie op punt gezet worden. Aan de hand hiervan kunnen veehouders objectief beslissen wanneer ze profylactische maatregelen tegen rotavirussen op hun bedrijf moeten instellen. Zo zullen de toegepaste hygiëneprotocollen, indien nodig, geoptimaliseerd worden. Ook zullen voedercomponenten met rotavirus neutraliserende eigenschappen gescreend en geëvalueerd worden, voor het toekennen van kwaliteitslabels¹.

Trefwoorden

- Diarree
- Rotavirus
- Biggen
- Longitudinale veldstudie
- Vlaamse varkensbedrijven

¹ Theuns (2015)

Inhoudsopgave

GEINTEGREERD EINDWERK	3
Titel	3
Longitudinale veldstudie om het belang van rotavirus infecties bij jonge biggen in Vlaanderen te situeren	3
Abstract	3
Trefwoorden	3
Inhoudsopgave	4
Technische fiche stagebedrijf	6
1 Voorstelling van het bedrijf	7
1.1 Organisatie	7
2 Doelstelling	8
2.1 Situering eindwerk	8
2.2 Centrale probleemstelling en doelstelling	8
2.3 Methodiek	8
3 Inleiding en literatuurstudie	9
3.1 Inleiding	9
3.2 Viruskarakteristieken	9
3.2.1 Virionstructuur	9
3.2.1.1 Genoomstructuur	11
3.2.2 Classificatie rotavirussen	12
3.2.2.1 Taxonomie	12
3.2.2.2 VP4 en VP7 serotypen	13
3.2.2.3 VP4 en VP7 genotypen	13
3.2.3 Replicatie	14
3.2.4 Epidemiologie	15
3.2.4.1 Epizootiologie bij het varken	15
3.2.4.2 Stabiliteit en infectiviteit	16
3.2.4.3 Interspecies transmissie en reassortering	17
3.2.5 Pathogenese, pathologie en klinische symptomen	18
3.2.6 Immuniteit	20
3.2.6.1 Humorele immuniteit bij rotavirus infecties	20
3.2.6.2 Cellulaire immuunrespons bij rotavirus infecties	21
3.2.6.3 Passieve immuniteit bij varkens	21
3.2.7 Diagnose	21
3.2.7.1 ELISA	21
3.2.7.2 PCR en RT-qPCR	22
3.2.8 Behandeling	22
3.2.9 Preventie	22
4 Materiaal en methoden	24
4.1 Anamnese geselecteerde bedrijven	24
4.1.1 Bedrijf 1: kraamstalproblematiek	24
4.1.2 Bedrijf 2: problematiek in de biggenbatterij	25
4.2 Studieprotocol	26
4.2.1 Bedrijf 1: kraamstal	26
4.2.2 Bedrijf 2: biggenbatterij	27
4.3 Klinische opvolging van de biggen	28
4.4 Kwantificatie van de rotavirus uitscheiding	28
4.5 Stamtypering rotavirus	29
4.6 Serum rotavirus-specifieke IgG antistoffenbepaling	30
4.7 Isoleren van <i>Escherichia coli</i> en typering	31
5 Resultaten	32
5.1 Bedrijf 1: kraamstal	32

5.1.1	Biggeninformatie en gewichtsevolutie	32
5.1.2	Diarree score	32
5.1.3	Fecale uitscheiding van groep A en C rotavirussen.....	33
5.1.4	<i>E. coli</i> detectie en typering	35
5.2	Bedrijf 2: biggenbatterij	36
5.2.1	Biggeninformatie en gewichtsevolutie	36
5.2.2	Diarree score	37
5.2.3	Fecale uitscheiding van groep A en C rotavirussen.....	37
5.2.4	IPMA	40
5.2.5	<i>E. coli</i> detectie en typering	40
6	Discussie en algemeen besluit.....	41
7	Bio-ethische reflectie.....	44
7.1	Ecologische pijler	44
7.2	Economische pijler	44
7.3	Sociale pijler.....	44
8	Publiceerbaar artikel	45
9	Voorstelling van de dagelijkse werkzaamheden	47
10	Werkzaamheden niet in functie van je eindwerk	49
11	Persoonlijke visie	50
11.1	Persoonlijke visie op het stagebedrijf	50
11.2	Persoonlijke visie op je stage en je functioneren.....	50
	Bijlagen	I
	Lijst met gebruikte afkortingen	VII
	Lijst met figuren.....	VIII
	Lijst met tabellen	IX
	Lijst met grafieken	X
	Bronvermelding	XI

Technische fiche stagebedrijf

Naam stagebedrijf:	Universiteit Gent – Faculteit Diergeneeskunde Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie		
Adres:	Salisburylaan 133		
	9820	Merelbeke	
Telefoonnummer:	09/264.75.19		
GSM-nummer:			
Faxnummer:			
E-mail:	sebastiaan.theuns@ugent.be		
Rector:	Prof. Dr. Anne De Paepe		
Stagementor:	Dr. Sebastiaan Theuns		
Sector:	Wetenschappelijk onderzoek		
Afdeling/Groep binnen het stagebedrijf:	Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie		
Aantal werknemers:	Universiteit Gent: 9000		
Omzet:			
Producten:			
Specialisatie:	Onderwijs, wetenschappelijk onderzoek en maatschappelijke dienstverlening		
Twee relevante publicaties van het stagebedrijf:	-Theuns, S., Vyt, P., Desmarets, L.M.B., Roukaerts, I.D.M., Heylen, E., Zeller, M., Van Ranst, M., Matthijnssens, J. & Nauwynck, H.J. (2015). Presence and characterization of pig group A and C rotaviruses in feces of Belgian diarrheic suckling piglets. <i>Virus Research</i> , 213, p.172-183. - Theuns, S., Heylen, E., Zeller, M., Roukaerts, I.D.M., Desmarets, L.M.B., Van Ranst, M., Nauwynck, H.J. & Matthijnssens, J. (2015). Complete genome characterization of recent and ancient Belgian pig group A rotaviruses and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses. <i>Journal of Virology</i> , 89, p.1043-1057.		
Bijkomende gegevens:			

1 Voorstelling van het bedrijf

De Rijksuniversiteit Gent werd in 1817 opgericht door de Nederlandse koning Willem I van Oranje. In 1991 zorgt een decreet van de Vlaamse Gemeenschap voor enkele wijzigingen: het RUG wordt omgedoopt tot Universiteit Gent (UGent) en de universiteit krijgt een grotere autonomie. Momenteel wordt de universiteit opgedeeld in 3 campussen en 11 faculteiten. Deze faculteiten worden nog eens onderverdeeld in 117 vakgroepen, die elk specifieke opleidingen aanbieden².

1.1 Organisatie

De campussen van de UGent bevinden zich in Gent, Kortrijk en Zuid-Korea. Het merendeel van de activiteiten van de universiteit vinden plaats op verschillende locaties in de regio Gent. De Campus Kortrijk biedt, samen met de vakgroep Industriële Biologische Wetenschappen en de vakgroep Industrieel Systeem- en Productontwerp, academische bachelor- en masteropleidingen aan in de Industriële Wetenschappen. In Zuid-Korea maakt de UGent deel uit van SGUC (Songdo Global University Campus). Hier biedt de Ghent University Global Campus drie bacheloropleidingen aan: Moleculaire Biotechnologie, Milieutechnologie en Voedseltechnologie³.

De Universiteit Gent bestaat uit 11 faculteiten, waar de faculteit Diergeneeskunde er één van is. De veeartsenijschool werd opgericht in 1933 als tweede diergeneeskundige school in België. Op 1 oktober 1968 begon de veeartsenijschool van Gent als autonome faculteit van de diergeneeskunde en werd zo de zevende faculteit van de UGent⁴. Een faculteit wordt bestuurd door een faculteitsraad, dewelke wordt voorgezeten door de decaan. De faculteitsraad bestaat uit een aantal professoren, assistenten, administratief en technisch personeel en studenten. Samen staan zij in voor de organisatie en coördinatie van de onderwijsverstrekking en de wetenschapsbeoefening. Naast de faculteitsraad, bestaan er ook meerdere commissies (bv. examencommissie)⁵. De Faculteit Diergeneeskunde wordt onderverdeeld in 12 vakgroepen. Eén van deze vakgroepen is de vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie. Elke vakgroep wordt voorgezeten door een vakgroepvoorzitter. De vakgroepen staan onder meer, elk in hun specifieke doelgebied, in voor onderzoek, diagnostiek en onderwijs⁶.

De Faculteit Diergeneeskunde in Merelbeke beschikt over vijf laboratoria en zeven dierenklinieken. De diergeneeskundige zorgen aan alle huisdieren (landbouw- en gezelschapshuisdieren, reptielen, vissen, knaagdieren, vogels,...) worden door de dierenklinieken en de laboratoria gewaarborgd⁷.

Op de faculteit kan men verder terecht voor de opleiding Diergeneeskunde (bachelor en master), Internship en Residency programma's en cursussen georganiseerd door het Instituut voor Permanente Vorming⁸.

² <http://www.ugent.be/nl/univgent>

³ <http://www.ugent.be/nl/univgent/campussen>

⁴ <http://www.ugent.be/di/nl/faculteit/historiek/overzicht.htm>

⁵ <http://www.ugent.be/di/nl/faculteit/raden/faculteitsraad>

⁶ <http://www.ugent.be/di/nl/onderzoek/vakgroepen>

⁷ <http://www.ugent.be/di/nl/dierenkliniek-labos>

⁸ <http://www.ugent.be/di/nl/opleidingen>

2 Doelstelling

2.1 Situering eindwerk

Dit eindwerk kadert in een IWT-LA project opgezet door het Laboratorium Virologie. Het doel van dit project is het ontwikkelen van een diagnostische strategie en het optimaliseren van preventieve middelen om rotavirus infecties bij jonge biggen te herkennen en controleren. Dit eindwerk focust zich op de kenmerken van het rotavirus en de longitudinale veldstudie om het belang van rotavirus infecties bij jonge biggen in Vlaanderen te situeren.

2.2 Centrale probleemstelling en doelstelling

Bij jonge biggen in de kraamstal en biggenbatterij vormt diarree een belangrijk gezondheidsprobleem. In Vlaanderen bedragen de jaarlijkse economische verliezen te wijten aan mortaliteit geassocieerde rotavirusdiarree in de kraamstal 1,8 miljoen euro. De laatste decennia werd er in Vlaanderen weinig onderzoek verricht naar de betrokkenheid van rotavirussen in de pathogenese ervan. Bovendien kan het virus mogelijk geassocieerd worden met groeivermindering in subklinisch geïnfekteerde dieren, hetgeen economische verliezen veroorzaakt.

Tijdens een 4-jaar durende studie wordt de klinische en economische impact van rotavirussen op Vlaamse varkensbedrijven bepaald. Vanuit deze resultaten kunnen eenvoudige controlemaatregelen opgesteld worden zoals verbeterde hygiëneprotocollen, voederadditieven en vaccinatie. De doelstelling van het eerste werkpakket uit dit project is een duidelijk beeld te vormen van de circulatie van rotavirussen op Vlaamse varkensbedrijven. Tegelijkertijd kan men de klinische en economische impact van rotavirussen inschatten.

2.3 Methodiek

Tijdens het eerste werkpakket zal er een longitudinale veldstudie gebeuren op 12 Vlaamse varkensbedrijven. De uitgekozen bedrijven hanteren verschillende managementsystemen, hebben een verschillende bedrijfsgrootte en passen diverse profylactische strategieën toe na het spenen. Biggen worden ofwel opgevolgd vanaf de partus tot aan het spenen, ofwel vanaf het spenen tot aan het einde van de batterijfase. Fecale swabs worden op vooraf vastgestelde tijdstippen verzameld en in het laboratorium kwantitatief geanalyseerd op de aanwezigheid van groep A en C rotavirussen met behulp van real-time PCR. Aan de hand van deze resultaten worden kinetieken van virale uitscheiding opgesteld. De ergheid van de virale vermeerdering wordt nadien gecorreleerd aan de groei, het voorkomen van diarree, geneesmiddelenverbruik en mortaliteit bij biggen. Tevens zal er ook nagegaan worden of een bloedname aan het begin en het einde van de batterijfase kan gebruikt worden om de graad van rotavirus besmetting op een bedrijf te bepalen.

3 Inleiding en literatuurstudie

3.1 Inleiding

In de vakliteratuur is er reeds veel beschreven over rotavirus infecties, zowel bij de mens als bij dieren. Ook naar het voorkomen van rotavirussen bij varkens werd al veel onderzoek uitgevoerd. Hierna volgt een introductie waarbij aspecten over het virus, de epidemiologie, replicatiecyclus en klinische symptomen worden toegelicht.

3.2 Viruskarakteristieken

Rotavirussen veroorzaken ernstige diarree bij mensen, meerdere zoogdieren en vogels. Het infectieus partikel van het rotavirus bestaat uit drie concentrische proteïnelagen. De buitenste laag bestaat uit VP7 (viraal proteïne 7) en VP4, dewelke neutraliserende antistoffen kunnen induceren. De middelste laag is opgebouwd uit VP6 en omringt de kern (binnenste laag). Deze laatste bestaat uit VP2 (als ondersteunend proteïne), enzymatische replicatiecomplexen (VP1 en VP3) en 11 segmenten van het dsRNA (dubbelstrengig RNA) genoom. Het rotavirus genoom codeert eveneens voor 6 niet-structurele proteïnen (NSP). Deze oefenen verschillende functies uit tijdens de virale replicatie en morfogenese. De differentiatie van rotavirussen in verschillende species gebeurde in het begin door middel van indirecte immunofluorescentietechnieken aangevuld met RNA fingerprinting. Antisera die gebruikt worden bij indirecte immunofluorescentietechnieken zijn gericht tegen VP6⁹.

3.2.1 Virionstructuur

Rotavirussen hebben een icosahedrale vorm met een diameter van 70-75 nm en worden niet omgeven door een envelop¹⁰. De structuur wordt weergegeven in Figuur 1. Het infectieus virion bestaat uit 3 proteïnelagen en wordt ook het drielagig partikel (3LP) genoemd. Van buiten naar binnen bestaat dit 3LP uit een buitenste kapsiedlaag (VP7 en VP4), een binnenste kapsied (VP6) en een centrale kapsiedkern (VP2)¹¹. De rol van het buitenste kapsied, bestaande uit VP7 en VP4, bestaat erin om virions vast te hechten aan het celoppervlak en tweelagige partikels (2LP's) af te leveren in het cytosol¹². Een tweelagig partikel of 2LP (Figuur 1), bestaat uit het binnenste kapsied en de kapsiedkern¹¹. Dit 2LP is transcriptioneel actief¹². Nieuw gesynthetiseerde RNA transcripten worden vrijgelaten uit het 2LP. Doorheen de replicatiecyclus blijft het tweelagig partikel intact¹³. Tot slot bestaat een 1LP, eenlagig partikel, enkel uit de kapsiedkern¹¹. De kapsiedkern omvat het gesegmenteerde dubbelstrengige RNA genoom¹³.

⁹ Matthijnssens *et al.* (2014)

¹⁰ Estes & Cohen (1989)

¹¹ Desselberger (2014)

¹² Estrozi *et al.* (2013)

¹³ Venkataram Prasad *et al.* (1988)

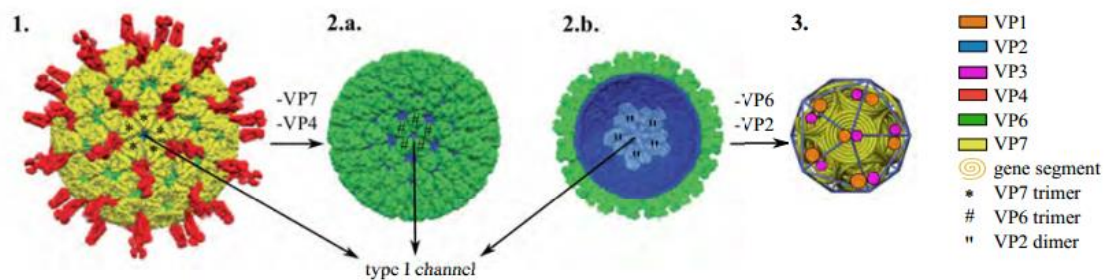


Fig. 1. Structuur van een rotavirus partikel: 1. drielagig partikel; 2.a. tweelagig partikel; 2.b. een doorsnede door een 2LP toont de kern (blauw) die is opgebouwd uit VP2 decameren (lichtblauw); 3. icosahedrale organisatie van gensegmenten en VP1 en VP3 proteïnen¹⁴.

Opbouw buitenste kapsied:

De buitenste laag van het 3LP bestaat uit twee structurele eiwitten: VP4 en VP7. VP7 is een glycoproteïne en vormt het hoofdbestanddeel van het buitenste kapsied. Van VP7 zijn 780 kopieën aanwezig die in 260 trimeren gegroepeerd zijn en 132 kanalen omgeven. Kenmerkend aan het buitenste kapsied zijn de 60 pieken die worden gevormd door trimeren van VP4. Elk rotavirus partikel bevat 120 kopieën van VP4. De VP4 spikes vertonen een duidelijke structuur bestaande uit een distaal globulair domein, een steelvormig lichaam en een proximaal globulair domein dat ingebed zit in de VP7 laag¹⁵.

VP4 is een niet-geglycosyleerd kapsiedeiwit dat wordt gecodeerd door genoomsegment 4. Het eiwit is verantwoordelijk voor een aantal biologisch belangrijke functies. In aanwezigheid van trypsine wordt VP4 gesplitst in VP5* en VP8*. Deze splitsing zorgt voor een verbeterde virale infectiviteit en maakt een betere penetratie van het virus in de cellen mogelijk. Het gebied grenzend aan de klievingsplaats induceert neutraliserende antistoffen.

VP7 is het tweede meest voorkomende kapsiedeiwit en wordt gecodeerd door genoomsegment 9. Dit glycoproteïne vertoont eveneens sterke immunogene eigenschappen en induceert neutraliserende antistoffen. Experimenten met humane en bovine rotavirussen wijzen zowel VP7 als VP4 aan als proteïnen die verantwoordelijk zijn voor vasthechting aan de cel¹⁶.

Opbouw binnenste kapsied:

Deze laag wordt gevormd door het VP6 eiwit en staat in direct contact met VP7 aan de apicale zijde en VP2 aan de basale zijde. Het binnenste kapsied bestaat uit 780 kopieën van VP6, die worden gerangschikt als 260 trimeren op het icosahedrale rooster. Deze trimeren bevinden zich direct onder de VP7 trimeren, zodat de kanalen in de VP7 en VP6 laag overeenkomen. VP6 is het grootste structurele eiwit van het rotavirus partikel. Het speelt een belangrijke rol in het structureren van het rotavirus partikel door de interactie met de buitenste kapsiedeiwitten, VP7 en VP4, en het kernkapsiedeiwit VP2¹⁷. VP6 vertoont zeer immunogene en antigenische eigenschappen en wordt daarom ook frequent als doelwit gebruikt in de diagnostiek¹⁸.

Opbouw kapsiedkern:

De kern bestaat uit 120 kopieën van het virale proteïne 2 (VP2) en heeft een icosahedrale symmetrie¹⁹. VP2, gecodeerd door genoomsegment 2, is een structureel eiwit dat in overvloed aanwezig is in de kern en is het derde meest voorkomende eiwit in 2LP's. VP2 is zeer immunogeen en antilichamen aanwezig in het serum vormen een goede indicatie voor

¹⁴ Theuns (2015)

¹⁵ Pesavento *et al.* (2006)

¹⁶ Estes & Cohen (1989)

¹⁷ Pesavento *et al.* (2006)

¹⁸ Zhu *et al.* (2013)

¹⁹ Li *et al.* (2009)

eerdere infecties. Bovendien is dit een structureel eiwit waarvan men heeft aangetoond dat het nucleïnezuur-bindende eigenschappen bezit (dsRNA, ssRNA en dsDNA). VP2 bindt bij voorkeur ssRNA in plaats van dsRNA, maar deze binding is niet sequentiespecifiek²⁰. De VP2 laag omringt het virale genoom, het RNA-afhankelijke RNA-polymerase (VP1) en het guanylyl- en methyltransferase (VP3). Naast verankering van VP1 in de kern, is VP2 een essentiële cofactor bij het starten van de dsRNA synthese door het polymerase²¹. VP1 en VP3 vormen een complex aan de binnenkant van de VP2 laag ter hoogte van de icosahedrale vijfvoudige assen. Interacties tussen VP2 of VP1 en nucleïnezuren blijken essentieel voor de endogene enzymatische activiteit van de kern²².

Kanalen:

De opbouw van het rotavirus wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van grote kanalen die door het buitenste en binnenste kapsied dringen. Deze kanalen maken het passeren van waterige substanties en biochemische substraten in en uit het kapsied mogelijk. In totaal zijn er 132 kanalen aanwezig. Ze worden onderverdeeld in 3 verschillende typen (type I, II en III) die elk op een andere plaats van het viruspartikel voorkomen²¹. Ontluikende transcripten verlaten het kapsied via 12 type I kanalen. Een studie, uitgevoerd door Periz en collega's, toont aan dat elk kanaal zich specialiseert in het verwijderen van transcripten afkomstig van een specifiek segment dat op zijn beurt gekoppeld is aan één transcriptiecomplex²³.

3.2.1.1 Genoomstructuur

Zoals wordt weergegeven in Figuur 2 bestaat het genoom van rotavirussen uit elf segmenten dsRNA. De gensegmenten variëren in grootte van 667 (NSP5) tot 3302 (VP1) baseparen. Het totale genoom telt ongeveer 18522 baseparen en codeert voor zes structurele eiwitten (VP1 tot VP4, VP6 en VP7) en zes niet-structurele eiwitten (NSP1 tot NSP6). Elk gensegment codeert voor één viraal proteïne, met uitzondering van gensegment 11 dat codeert voor NSP5 en NSP6²².

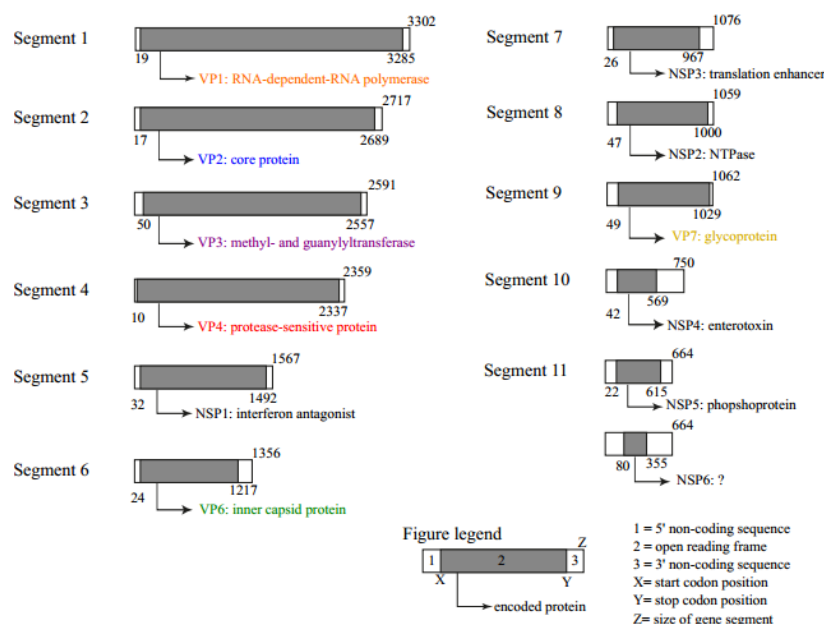


Fig. 2. Organisatie van het rotavirus genoom volgens grootte en bijhorende eiwitten²⁴

²⁰ Estes & Cohen (1989)

²¹ Pesavento *et al.* (2006)

²² Zeng *et al.* (1998)

²³ Periz *et al.* (2013)

²⁴ Theuns (2015)

3.2.2 Classificatie rotavirussen

3.2.2.1 Taxonomie

Rotavirussen behoren tot de familie van de *Reoviridae*. Deze familie kan men opsplitsen in 2 subfamilies: de *Sedoreovirinae* en de *Spinareovirinae*, waaronder respectievelijk 6 en 9 genera vallen (Tabel 1). Eén van de genera die tot de subfamilie van de *Sedoreovirinae* behoort, is het genus *Rotavirus*²⁵.

Tabel 1. Taxonomie rotavirus

Familie	<i>Reoviridae</i>	
Subfamilie	<i>Sedoreovirinae</i>	<i>Spinareovirinae</i>
Genera	<i>Cardoreovirus</i>	<i>Aquareovirus</i>
	<i>Mimoreovirus</i>	<i>Coltivirus</i>
	<i>Orbivirus</i>	<i>Cypovirus</i>
	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Dinovernavirus</i>
	<i>Rotavirus</i>	<i>Fijivirus</i>
	<i>Seadornavirus</i>	<i>Idnoreovirus</i>
		<i>Orthoreovirus</i>
		<i>Mycoreovirus</i>
		<i>Oryzavirus</i>

Momenteel worden er acht rotavirus species (A tot en met H) officieel erkend door het ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses)²⁶. In Hongarije werd er recent bij honden mogelijk een nieuwe groep I geïdentificeerd, deze wordt momenteel verder geratificeerd door het ICTV²⁷.

In een recente studie werden de VP6 sequentie data voor RVA, RVB, RVC, RVD, RVF, RVG en RVH overgemaakt uit databases en geëxploiteerd om een sequentie-gebaseerde classificatiestrategie te ontwikkelen. Op deze manier kan een onderscheid gemaakt worden tussen de virale species behorende tot het genus *Rotavirus*. De paper stelt een aminozuur gelijkenis voor van 53% van het VP6 proteïne om een onderscheid te maken tussen de verschillende groepen rotavirussen²⁸.

Groep A rotavirussen spelen een belangrijke rol in het ontstaan van diarree, zowel bij de mens als bij gedomesticeerde zoogdieren en pluimvee. Rotavirussen uit groep B en C werden geïdentificeerd bij meerdere zoogdieren, inclusief de mens. Bij varkens werden reeds rotavirussen uit groepen A, B, C en H aangetroffen²⁹. Ook bij mensen komen infecties met RVH voor³⁰. Tot nu toe kon men groepen D, F en G enkel terugvinden bij pluimvee²⁹.

Rotavirussen kunnen opgedeeld worden in twee fylogenetische clusters op basis van hun aminozuur- en nucleotidensequenties. Zo behoren RVA, RVC, RVD en RVF tot de ene cluster, terwijl de andere cluster gevormd wordt door RVB, RVG en RVH³¹, zoals wordt weergegeven in Figuur 3.

²⁵ Desselberger (2014)

²⁶ Matthijnsens & Theuns (2015)

²⁷ Mihalov-Kovács *et al.* (2015)

²⁸ Matthijnsens *et al.* (2014)

²⁹ Martella *et al.* (2010)

³⁰ Marthaler *et al.* (2014)

³¹ Matthijnsens *et al.* (2012)

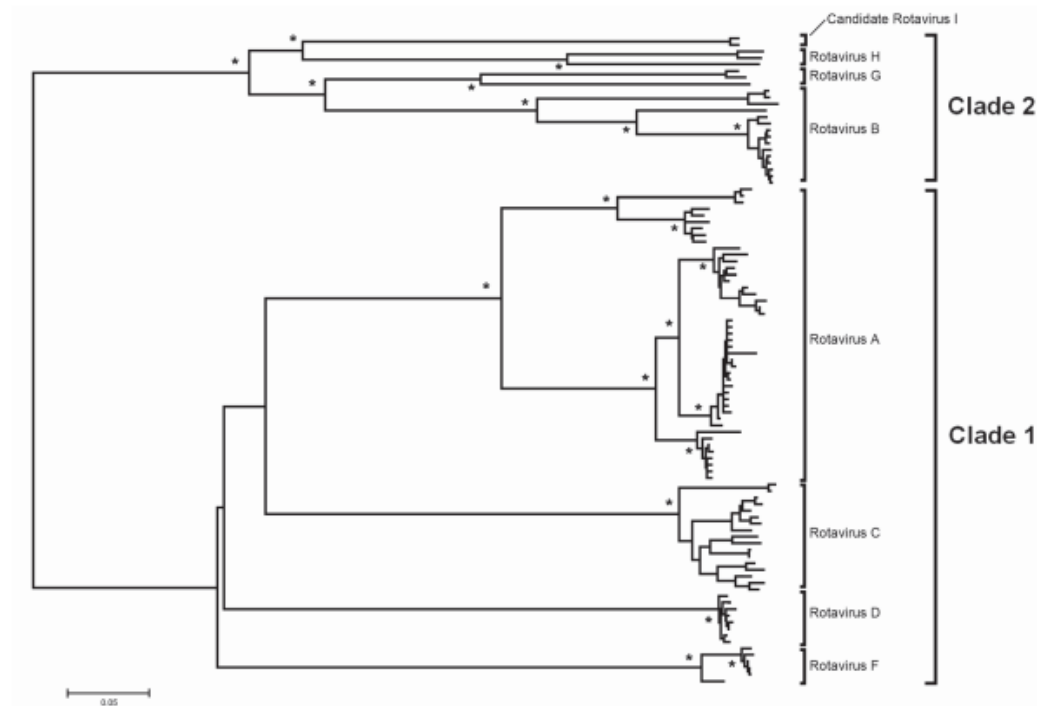


Fig. 3. Fylogenetische verwantschap tussen de verschillende rotavirus species³²

3.2.2.2 VP4 en VP7 serotypen

Analyse van monoklonale antilichamen gericht tegen de buitenste kapsiedeiwitten VP4 en VP7 heeft aangetoond dat zowel VP4 als VP7 epitopen dragen die verantwoordelijk zijn voor het opwekken van neutraliserende antistoffen. Later onderzoek definieerde de onafhankelijke beschermende immuuneigenschappen van VP7 en VP4. Op basis hiervan werd een classificatiesysteem ontwikkeld om de neutralisatiespecificiteit van zowel VP4 als VP7 vast te stellen.

Aangezien VP7 een glycoproteïne is, wordt het VP7 serotype aangeduid als het G-serotype. Diezelfde denkwijze wordt toegepast voor VP4, een protease-sensitief eiwit, dat wordt aangeduid als het P-serotype³³.

3.2.2.3 VP4 en VP7 genotypen

Niet alle rotavirus stammen zijn cultiveerbaar in cellen en bovendien zijn er niet altijd specifieke monoklonale antistoffen beschikbaar voor typering. De celculturen die gebruikt worden zijn afkomstig van de nier van de Afrikaanse groene aap en dus ook niet relevant voor de *in vivo* doelwitcel, de enterocyt. Tegenwoordig wordt serotypering dus vervangen door genotypering, hetgeen gebaseerd is op de overeenstemming tussen de nucleotide sequenties van verwante rotavirus gensegmenten³³. Tot nu toe kon men 28 G-genotypes en 39 P-genotypes onderscheiden³⁴. Wanneer de nucleotidesequenties van de gensegmenten coderend voor VP7 en VP4 van verschillende stammen meer dan 80% gelijkend zijn, dan behoren ze tot hetzelfde genotype. Voor de formele numerieke aanduidingen van G-genotypen gebruikt men 1 getal (bijvoorbeeld G1)³³. Voor VP4 gebruikt men eveneens een grenswaarde van 80% nucleotidesequentie overeenstemming³⁵. Een P-genotype wordt aangeduid als een P gevolgd door het toegewezen getal tussen vierkante haken (bijvoorbeeld P[8])³³.

³² Mihalov-Kovács *et al.* (2015)

³³ Hoshino & Kapikian (2000)

³⁴ Matthijnsens & Theuns (2015)

3.2.3 Replicatie

De intrede van het rotavirus in een gastheercel is een complex proces dat in verschillende stappen verloopt³⁵. Figuur 4 toont een overzicht van de replicatiecyclus bij rotavirussen. Allereerst hecht het virion zich vast aan de mature enterocyten op het uiteinde van de darmvlokken in het ileum en jejunum (doelwitcel). Vele isolaten binden siaalzuren aanwezig op het celoppervlak met behulp van VP8* (geproduceerd door splitsing van VP4 in VP5* en VP8* door trypsine), dat aanwezig is op de spikes van het virion. Niet-clathrine en niet-caveoline-gemedieerde endocytose levert het virion aan het vroege endosoom. Verminderde calciumconcentraties zorgen voor het ontmantelen van het 3LP (verlies van VP7/VP4 laag) en de penetratie van de membraan door VP5*. Het verlies van de buitenste kapsiedlaag en de vrijstelling van het 2LP in het cytosol activeert het interne polymerasecomplex (VP1 en VP3) om positief geladen RNA af te schrijven vanaf elk van de 11 dsRNA genomegmenten. Positief geladen RNA dient ofwel als blauwdruk voor de synthese van virale eiwitten door cellulaire ribosomen of als template voor de synthese van negatief geladen RNA tijdens de genome replicatie. NSP2 en NSP5 werken samen om virale inclusielichaampjes of viroplasmen te vormen, die componenten sekwestreren die nodig zijn voor de genome replicatie en de vorming van één- en tweelagige partikels. Genomeverpakking wordt gestart wanneer VP1 (en vermoedelijk VP3) bindt aan het 3' uiteinde van het positief geladen virale RNA. Het binnenste kapsiedeiwit VP6 plaatst zich op het ontluikende kernkapsied om een 2LP te vormen. De assemblage van het buitenste kapsied is niet goed begrepen. Het huidige model stelt dat NSP4 instaat voor het rekruteren van 2LP's en VP4 naar het cytosolisch oppervlak van het endoplasmatische reticulum (ER) membraan. De daaropvolgende verwijdering van het ER membraan en het NSP4 maakt de montage van het buitenste kapsiedeiwit, VP7, mogelijk met de vorming van een 3LP. Bij vrijlating uit de geïnfecteerde cel wordt het virion blootgesteld aan trypsine-achtige proteasen van het maagdarmkanaal, wat resulteert in de specifieke splitsing van VP4 in VP5* en VP8* om zo het volledig infectieus virion te vormen³⁶.

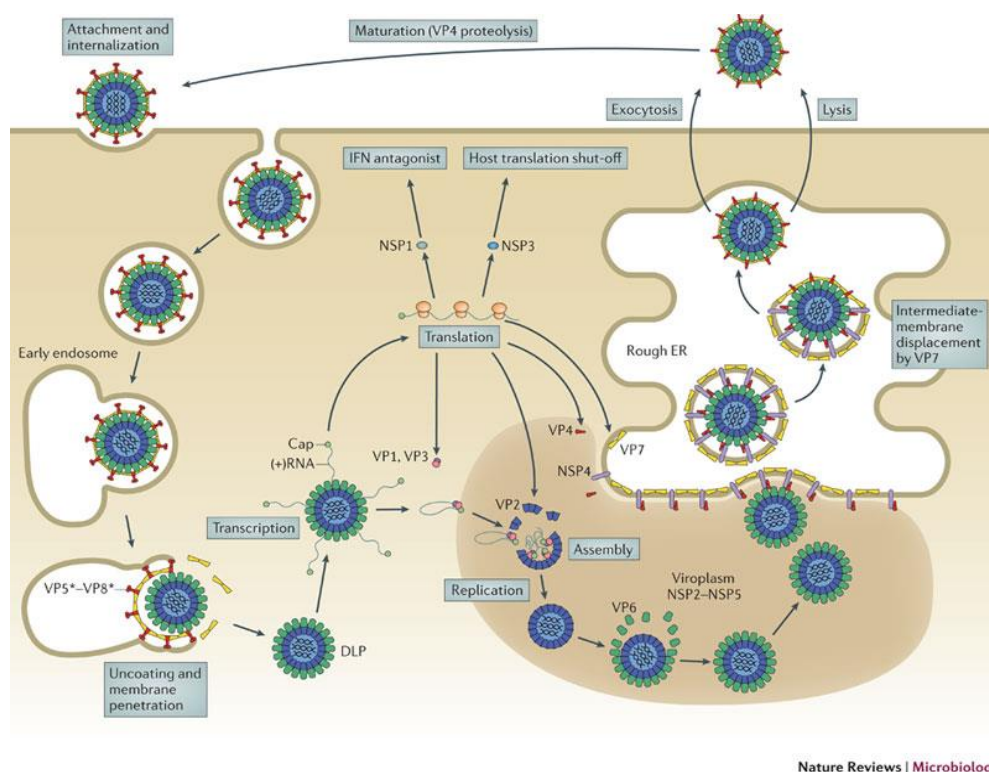


Fig. 4. Replicatiecyclus rotavirus³⁷

³⁵ Ruiz *et al.* (2009)

³⁶ Trask *et al.* (2012)

3.2.4 Epidemiologie

3.2.4.1 Epizoötiologie bij het varken

Het voorkomen van rotavirus infecties bij varkens werd voor het eerst gesuggereerd toen men ontdekte dat sera van varkens antistoffen tegenover het bovine rotavirus bevatten. Dit werd in 1973 gevolgd door de ontdekking van rotavirus partikels in de feces van biggen met diarree door middel van transmissie elektronenmicroscopie (TEM). Sindsdien werden rotavirus infecties, en de diarree die ermee gepaard gaat, waargenomen bij varkens over de hele wereld³⁷.

Porciene rotavirussen komen wereldwijd enzoötisch voor in elke varkenspopulatie en op elk varkensbedrijf. Op bedrijven hebben 90% tot 100% van de volwassen varkens antistoffen tegenover het virus. Het al of niet ontstaan van diarree wordt bepaald door meerdere factoren zoals de infectiedosis, het tijdstip van infectie en de graad van lactogene immuniteit. Aangezien er meestal meerdere genotypen op een bedrijf aanwezig zijn, is het mogelijk dat meerdere rotavirus infecties elkaar opvolgen. Opeenvolgende infecties van tomen op een bedrijf en de uitgesproken resistentie van het virus zorgen voor het enzoötische karakter³⁸.

Rotavirussen behorende tot groep A worden het vaakst teruggevonden bij varkens jonger dan 60 dagen. De hoogste prevalentie wordt waargenomen op een leeftijd van 3 tot 5 weken. De prevalentie van infectie stijgt met de leeftijd tijdens de zoogperiode, dit zou het gevolg kunnen zijn van een daling in maternale antistoffentiters. Het is eveneens niet ondenkbaar dat er andere factoren spelen die zorgen voor deze stijging, zoals bijvoorbeeld de opname van creep feed waardoor biggen minder melk gaan drinken bij de zeug. Wanneer de maternale verworven immuniteit afneemt tot een bepaald niveau, worden biggen vatbaar voor een infectie. Geïnfecteerde biggen scheiden gedurende 1 tot 14 dagen virus uit in de feces³⁹. Biggen afkomstig van gelten worden meestal vroeger geïnfecteerd met groep A rotavirus (5 tot 14 dagen) dan biggen afkomstig van zeugen (21 tot 35 dagen). Ook biggen die gespeend worden op een leeftijd van twee weken ontwikkelen vroeger groep A rotavirus infecties en vertonen ernstigere diarree dan biggen gespeend op 4 tot 5 weken ouderdom³⁸.

Infecties met groep C rotavirussen worden voornamelijk teruggevonden in biggen jonger dan 21 dagen, terwijl rotavirus A en B infecties eerder optreden in biggen ouder dan 21 dagen⁴⁰. De morbiditeit varieert van 60% tot 80%³⁹.

Porciene groep A rotavirussen worden geassocieerd met enteritis bij biggen voor en na het spenen. Rotavirussen behorende tot groep A zijn één van de meest gedetecteerde virale agentia die in verband gebracht worden met diarree bij biggen, maar wordt ook teruggevonden bij biggen zonder diarree. Zowel in endemische als epidemische vormen van diarree worden RVA infecties bij varkens herkend. Co-infecties met andere darmpathogenen (virussen, bacteriën of parasieten) kunnen zorgen voor een verergering van de ziekte bij biggen⁴¹.

Papp en collega's analyseerden recent 55 publicaties over RVA stammen die wereldwijd teruggevonden werden bij varkens, om de meest voorkomende porciene RVA stammen te definiëren⁴². Tot dusver zijn er twaalf G-genotypes (G1 tot G6, G8 tot G12 en G26) en dertien P-genotypes (P[1], P[5] tot P[8], P[11], P[13], P[19], P[23], P[26], P[27], P[32] en

³⁷ Fu (1988)

³⁸ Nauwynck (2012)

³⁹ Straw *et al.* (2006)

⁴⁰ Marthaler *et al.* (2014)

⁴¹ Martella *et al.* (2010)

⁴² Papp *et al.* (2013)

P[34]) gedetecteerd bij biggen met en zonder diarree. Wereldwijd komt de G5P[7] stam het meeste voor bij varkens⁴³.

Onder natuurlijke omstandigheden wordt het rotavirus geassocieerd met twee algemene diarreesyndromen bij varkens. Het eerste syndroom wordt 'witte diarree' of 'melkdiarree' genoemd en komt voor bij biggen van twee tot vier weken oud. Dit syndroom wordt gekenmerkt door het voorkomen van witte of gele diarree. De ontwikkeling van melkdiarree valt samen met de uitscheiding van RVA in de mest⁴⁴. Geïnfecteerde dieren ontwikkelen meestal een milde diarree gedurende één tot drie dagen. Dehydratatie komt duidelijker voor bij biggen jonger dan tien dagen en bij biggen met langdurige diarree⁴⁵.

Het tweede syndroom wordt 'speendiarree' genoemd en treedt op 4 tot 7 dagen na spenen. Biggen die vroeggespeend worden op zeer jonge leeftijd (1 tot 3 dagen oud) worden zwaarder getroffen. De effectieve rol van rotavirussen bij speendiarree is niet geheel duidelijk, aangezien voedingsfactoren en de aanwezigheid van enterotoxigene *Escherichia coli* (ETEC) eveneens hun invloed kunnen uitoefenen⁴⁶. Een studie uitgevoerd door Lecce en collega's toont aan dat de beschadiging van het dunne darmepitheel door het rotavirus veranderingen veroorzaakt in het lumen, waardoor de kolonisatie van ETEC wordt bevorderd⁴⁷.

3.2.4.2 Stabiliteit en infectiviteit

Op plaatsen waar jonge biggen werden gehuisvest kunnen rotavirussen aangetoond worden in stof en uitgedroogde feces. Bij 18-20°C kunnen rotavirus partikels in feces infectieus blijven gedurende 7 tot 9 maanden. De infectiviteit verdwijnt niet als de feces wordt bewaard bij 10°C gedurende 32 maanden. Doordat rotavirussen persisteren in de omgeving, worden varkens constant blootgesteld aan het virus³⁹.

Rotavirussen ondergaan geen inactivatie bij het gebruik van vele chemische desinfectantia en antiseptica. Desinfectantia zoals fenolen, formaline, chlorine en β -propiolactone zorgen wel voor inactivatie van het virus. Ethanol (95%) oefent zijn effect uit op het virus door het buitenste kapsied te verwijderen. Ontsmettingsmiddelen die ethanol, javel en op fenol gebaseerde producten bevatten, zorgen voor een effectieve titerdaling van 95% tot 99% na een behandeling van 10 minuten⁴⁸.

Naakte virussen zoals het rotavirus vertonen meer resistentie tegenover desinfectie dan andere pathogenen aanwezig op bedrijven. Aangezien het virus wordt overgedragen via fecaal-orale weg kan het gebruik van een effectief desinfectiemiddel, dat zelfs werkt in aanwezigheid van organisch materiaal, kostenbesparend werken in termen van ziekte-uitbraken en virale contaminatie. Uitbraken van rotavirussen op varkensbedrijven zorgen immers voor economische verliezen door productieverlies.

Een recente studie, uitgevoerd door Chandler-Bostock en Mellits, onderzocht de werkzaamheid van zes desinfectiemiddelen tegen porciene RVA's in aanwezigheid van zowel hoge (10% foetaal kalfsserum, 20% gistextract) als lage (3% foetaal kalfsserum) concentraties biologische materie. Een op fenol gebaseerd desinfectans bleek het meest effectief om rotavirussen te inactiveren in aanwezigheid van hoge concentraties organische materie. Desinfectantia gebaseerd op iodoforen bleken onder geen enkele voorwaarde een significant virusdodend effect uit te oefenen tegen het virus. De effectiviteit van ontsmettingsmiddelen gebaseerd op peroxideverbindingen of glutaraaldehyde wordt sterk bepaald door de aanwezige concentratie aan organisch materiaal. Deze bevindingen

⁴³ Papp *et al.* (2013)

⁴⁴ Fu (1988)

⁴⁵ Straw *et al.* (2006)

⁴⁶ Fu (1988)

⁴⁷ Lecce *et al.* (1982)

⁴⁸ Straw *et al.* (2006)

benadrukken het belang van een grondige reiniging met detergent alvorens te starten met de desinfectie. Op deze manier vermindert de virale contaminatie op de boerderij en kan de incidentie van rotavirus infecties bij varkens dalen⁴⁹.

3.2.4.3 Interspecies transmissie en reassortering

Meerdere studies hebben aangetoond dat transmissie van rotavirussen tussen verschillende diersoorten kan optreden. Bovendien kunnen rotavirussen reassortering ondergaan door hun gesegmenteerde genoom⁵⁰.

Hoewel rotavirussen bij voorkeur de homologe species infecteren, kunnen heterologe rotavirus infecties voorkomen onder natuurlijke en experimentele omstandigheden. Studies bij konijnen en muizen hebben aangetoond dat enkel homologe virussen efficiënt kunnen vermenigvuldigen en horizontaal spreiden. Omgekeerd hebben een aantal studies ook al bewezen dat onder experimentele omstandigheden rotavirusstammen heterologe species kunnen infecteren en diarree veroorzaken. Humane RVA stammen bleken ziekte te veroorzaken in verscheidene pasgeboren dieren.

Genetische analyse van humane en dierlijke RVA stammen hebben verschillende voorbeelden van directe interspecies transmissie onder natuurlijke omstandigheden aangetoond. Uit volledige genoomsequencing is gebleken dat de G3P[3] humane stammen Ro1845 en HCR3A nauw verwant zijn aan de caniene stammen CU-1, K9 en A79-10 en aan de feliene stam Cat97⁵¹.

Tabel 2 toont de genetische verwantschap tussen humane en dierlijke RVA stammen. Zo worden genotype 1 genen (groen) gedeeld tussen humane Wa-achtige stammen en varkensrotavirussen, hetgeen een evolutionaire verwantschap suggereert⁵². Deze verwantschap werd aangetoond in een studie uitgevoerd door Theuns en collega's. Een gelijkaardige evolutionaire verwantschap werd verondersteld te bestaan tussen humane DS-1-achtige stammen en bovine RVA stammen, aangezien zij verschillende genotype 2 genen delen (rood). Tot slot denkt men dat humane AU-1-achtige stammen evolutionair verwant zijn met stammen van katten, omdat ze over dezelfde genotype 3 genen (oranje) beschikken⁵³.

Tabel 2. Genetische verwantschap tussen RVA stammen⁵⁴

Species		VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
	<i>Wa-like</i>	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	<i>DS-1-like</i>	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	<i>AU-1-like</i>	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
	pig	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
	cow	G6	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
	cat	G3	P[9]	I3	R3	C2	M3	A3	N1	T3	E3	H3

De mechanismen achter rotavirus diversificatie omvatten een positieve accumulatie van enkelvoudige puntmutaties en intersegmentale recombinatie en herschikking, met name reassortering. Reassortering van dierlijke virussen met humane stammen zorgt voor het ontstaan van chimere virussen die dsRNA segmenten dragen van beide oudervirussen na infectie van 2 virussen in één cel. Vermoedelijk zijn rotavirussen niet in staat om de

⁴⁹ Chandler-Bostock & Mellits (2015)

⁵⁰ Straw *et al.* (2006)

⁵¹ Martella *et al.* (2010)

⁵² Theuns (2015)

⁵³ Theuns *et al.* (2015)

⁵⁴ Theuns *et al.* (2015)

gastheerbarrière op een efficiënte manier te doorbreken en te infecteren en spreiden in een nieuwe gastheer⁵⁵.

3.2.5 Pathogenese, pathologie en klinische symptomen

Vele factoren spelen een rol in de pathofysiologie van rotavirusdiarree: een verhoogde secretie, veranderde motiliteit, celdood en een vermindering van het absorberend oppervlak van de darm wat leidt tot malabsorptie. Een verstoring van de besmette enterocyten kan ook gebruikt worden om virusnakomelingen en producten van virale synthese vrij te laten, wat een verdere uitbreiding van de ziekte met zich meebrengt. Een rotavirusinfectie van de gastheer cel wordt gekenmerkt door een aantal Ca^{2+} -afhankelijke virus-cel interacties. Tijdens de replicatiecyclus, vanaf de intrede in de cel tot het vrijkomen van nieuw gevormde virions, bewegen de nieuw gevormde virions doorheen verschillende cellulaire compartimenten. Elk compartiment wordt gekenmerkt door een verschillende Ca^{2+} concentratie⁵⁶.

De pathogenese van rotavirus is complex en het ontstaan van diarree omvat verschillende mechanismen. Malabsorptie veroorzaakt door hypersecretie, met het verlies van intestinale absorberende cellen tot gevolg, wordt algemeen aanvaard als oorzaak van rotavirus geïnduceerde diarree bij varkens en mensen. Studies hebben aangetoond dat intestinale inflammatoire responsen, de activatie van het enterisch zenuwstelsel en de enterotoxigene functie van NSP4 eveneens bijdragen tot het ontstaan van diarree bij rotavirus infecties. Rotavirus partikels worden oraal opgenomen en vermenigvuldigen overwegend in het cytoplasma van gedifferentieerde villus-epitheelcellen van de dunne darm. Virusreplicatie in de enterocyten van de villi resulteert in cellyse en daaropvolgend afstomping van de villi en villusatrofie. De mate van villusatrofie en de verspreiding van atrofische villi in de dunne darm is onder meer afhankelijk van de rotavirusstam en de leeftijd van het varken. Over het algemeen ziet men een ernstigere en uitgebreidere villusatrofie bij jonge varkens.

Het ontstaan van een darmontsteking activeert de neurale reflexen van het enterisch zenuwstelsel. Deze spelen een belangrijke rol in de regulatie van de vloeistofsecretie in een gezonde darm en spelen een hoofdrol in de pathofysiologie van onder andere rotavirussen. De ontsteking zorgt ook voor het verbreken van de mucosale integriteit en veroorzaakt lekkage van membranen. Hierdoor vindt een verdere translocatie van bacteriën en toxines plaats doorheen de intestinale epitheelbarrière, hetgeen kan leiden tot een systemische infectie. Rotavirus infecties kunnen varkens vatbaarder maken voor ernstigere bacteriële infecties door een verhoogde opname van bacteriële toxines die kunnen leiden tot septicemie. NSP4 zou een indirecte rol spelen in de stimulatie van het enterisch zenuwstelsel door een effect uit te oefenen op de intracellulaire calciumconcentratie in endocriene cellen⁵⁷.

⁵⁵ Martella *et al.* (2010)

⁵⁶ Hoshino & Kapikian (2000)

⁵⁷ Straw *et al.* (2006)

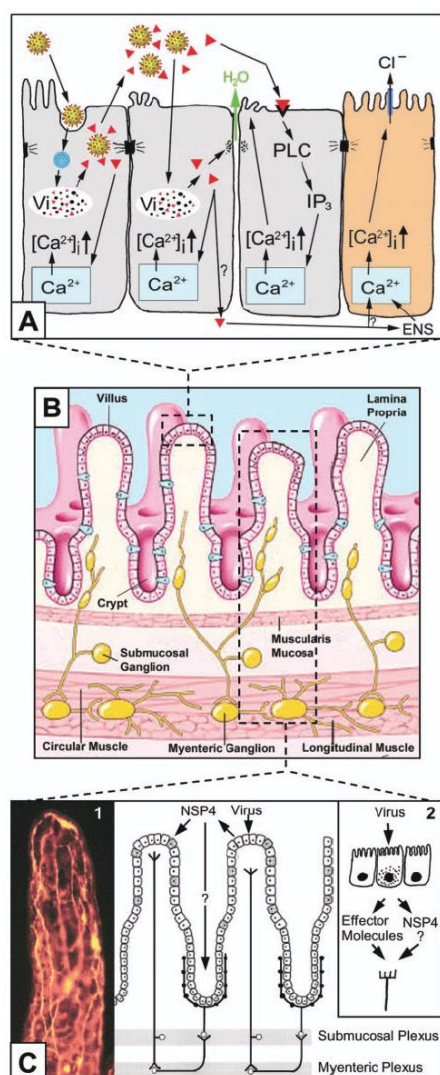


Fig. 5. Voorstelling van rotavirus geïnduceerde diarree. Luik A toont de opeenvolgende gebeurtenissen in het geïnfecteerd epitheel. Luik B stelt de normale opbouw van de dunne darm voor en benadrukt het EZS met ganglia gelegen op verschillende submucosale niveau's. Luik C toont een reflexboog van het EZS dat signalen ontvangt van het villusepitheel en het crypte-epitheel activeert. Inzet 1 toont de rijke innervatie in een villus. Inzet 2 toont aan dat geïnfecteerde enterocyten het EZS kunnen stimuleren door de basolaterale vrijstelling van NSP4 of andere effector moleculen⁵⁸.

In luik A stelt cel 1 (links) de initiële cel voor die geïnfecteerd wordt door viruspartikels aanwezig in het darmlumen. Na virusintrede in de cel en ontmanteling van het 3LP wordt het viroplasm gevormd, gevolgd door de vrijlating van virus en virale eiwitten. Intracellulair NSP4 (rode driehoeken) induceert de vrijstelling van Ca^{2+} uit het endoplasmatisch reticulum (blauw) waardoor de intracellulaire calciumconcentratie zal stijgen. Cel 2 geraakt secundair geïnfecteerd na vrijkomen van het virus uit de initiële cel. NSP4, geproduceerd door de infectie, zorgt voor een onderbreking van de tight junctions waardoor een paracellulaire stroom van water en elektrolyten optreedt (groene pijl). In cel 3 bindt NSP4 aan een specifieke receptor op de cel en triggert een signaalcascade hetgeen resulteert in de vrijstelling van Ca^{2+} en een stijging van de intracellulaire calciumconcentratie. Deze stijging zorgt voor een verbreking van het microvillair cytoskelet. Cel 4 (rechts) wordt afgebeeld als een bruine cel en stelt een cryptecel voor. NSP4 kan direct op deze cel inwerken of het enterisch zenuwstelsel (EZS) stimuleren. Stimulatie van het EZS zorgt voor een stijging van de intracellulaire calciumconcentratie waardoor er Cl^- secretie zal plaatsvinden⁵⁷.

Rotavirus infecties kunnen asymptomatisch blijven of tot acute gastro-enteritis met lichte tot ernstige diarree leiden. Ook braken en verschillende gradaties van dehydratatie komen voor. De lichaamstemperatuur is vaak slechts matig verhoogd. Braken treedt voorafgaand aan de diarree op en duurt een kortere periode (3 dagen vs. 5 dagen). Een grote disbalans in de

⁵⁸ Ramig (2004)

elektrolytenhuishouding leidt vaak tot ernstige uitdroging. Sterfte door rotavirus infecties is dan ook te wijten aan de ernstige dehydratatie en cardiovasculair falen⁵⁹.

Gnotobiotische biggen krijgen waterige diarree 18 tot 24 uur na experimentele inoculatie. Biggen sterven door dehydratatie of herstellen na één week. De meeste rotavirus infecties bij biggen verlopen onder natuurlijke omstandigheden subklinisch. De diarree die eventueel ontstaat moet als multifactorieel beschouwd worden. Factoren zoals infectiedosis, leeftijd van infectie, lactogene immuniteit, co-infecties met andere bacteriën of virussen, management,... spelen een rol in het bepalen of een infectie al dan niet leidt tot diarree⁶⁰. Infectieuze oorzaken van diarree bij biggen zijn van virale (PEDV, TGEV), bacteriële (enterotoxigene *E. coli*, *Clostridium perfringens* type A en C, *Clostridium difficile*, *Salmonella* spp., *Brachyspira* spp. en *Lawsonia intracellularis*) of parasitaire (*Cystoisospora suis*) oorsprong⁶¹.

3.2.6 Immuniteit

Immuniteit ontstaat als gevolg van een interactie tussen lichaamsvreemde stoffen (antigenen) en meerdere soorten lichaamscellen, zoals macrofagen en lymfocyten. Deze interactie geeft aanleiding tot circulerende antistoffen (humorale immuniteit) en cellen (cellulaire immuniteit) die specifiek vreemde indringers zoals virussen, bacteriën of parasieten gaan opruimen⁶².

3.2.6.1 Humorale immuniteit bij rotavirus infecties

Bij rotavirus infecties worden verworven immuunreacties uitgelokt, onder meer door B-cellen die antilichamen produceren tegen virus specifieke eiwitten. Deze B-cellen bieden een langdurige bescherming. Veel antilichamen, voornamelijk gericht tegen VP7 en VP4, vertonen neutraliserende eigenschappen *in vitro* en beschermende eigenschappen *in vivo*. Humorale antilichamen worden, na herhaalde infectie, gestimuleerd tegen epitopen op VP4 en VP7 moleculen en bieden kruisbescherming⁶³.

Immunoglobuline A (IgA) komt voornamelijk als dimeer in lage concentraties voor in het serum. Ze zijn sterk vertegenwoordigd in secreties van de darm, melk, long, tranen en urine. Secretorische IgA's hebben dezelfde basisstructuur als serum IgA's, maar bevatten een extra eiwitketen (de secretorisch component). Deze secretorische component wordt aangemaakt door epitheelcellen van de darm, longen, uier, speekselklier en traanklier. Na synthese wordt de secretorische component vastgehecht op de externe zijde van deze epitheelcellen, waar hij dienst doet als IgA receptor. Wanneer een IgA dimeer zich bindt aan de secretorische component, wordt het complex geëndocyteerd en door het cytoplasma vervoerd naar de apicale zijde van de cel. Daar wordt het sIgA geëxcreteerd en komt het in de secreties terecht. De secretorische component beschermt het IgA molecule tegen proteolytische enzymen die aanwezig zijn in (darm)secreties. IgA wordt in het darmkanaal gesynthetiseerd door plasmacellen afkomstig van B lymfocyten uit het lymfoïde weefsel van de darm (GALT)⁶⁴.

Om nakomelingen te beschermen tegenover enterische pathogenen, worden er neutraliserende antilichamen gesecreteerd in de melk. Een enterische infectie leidt tot een lokale stimulatie van de immuniteit, maar bij monogastrische dieren (zoals het varken) bestaat er een immunologische link tussen darm-geassocieerde lymfoïde weefsels en de melkklier. IgA antilichamen worden gesecreteerd in de melk als sIgA na passage doorheen het melkklierepitheel. Om een goede lactogene bescherming te onderhouden, zou de zeug geregeld opnieuw geïnfecteerd moeten worden met deze pathogenen⁶⁵.

⁵⁹ Desselberger (2014)

⁶⁰ Nauwynck (2012)

⁶¹ Theuns (2015)

⁶² Andries (1998)

⁶³ Desselberger (2014)

⁶⁴ Andries (1998)

⁶⁵ Theuns (2015)

3.2.6.2 Cellulaire immuunrespons bij rotavirus infecties

Rotavirus infecties lokken eveneens een cellulaire immuunrespons uit, waarbij T-cellen T-cel specifieke rotavirus epitopen op het oppervlak van geïnfecteerde cellen herkennen. De passieve overdracht van rotavirus-specifieke CD8⁺ T-cellen werkt eveneens beschermend⁶⁴. Geactiveerde cytotoxische T-cellen (CD8⁺) sporen vreemde cellen op. Enkel de vreemde cellen die dezelfde combinatie van vreemd antigeen met antigenen van MHC klasse I presenteren, worden herkend. Bij herkenning hecht de cytotoxische T-cel zich vast op de vreemde cel en zal het deze cel doden. Eén cytotoxische T-cel is in staat om meerdere cellen te doden zonder zelf beschadigd te worden. Rotavirus-specifieke T-cellen spelen een rol bij de viruseliminatie na een primaire infectie⁶⁶.

3.2.6.3 Passieve immuniteit bij varkens

Biggen worden geboren zonder gammaglobulinen en krijgen circulerende maternale antistoffen binnen bij de opname van colostrum en melk. Colostrale antistoffen kunnen slechts tot 24-36 uur na de geboorte worden opgenomen, voordat de darmbarrière sluit. Hierna kunnen deze antistoffen niet meer geabsorbeerd worden uit de darm en enkel lokaal in de darm bescherming bieden. Colostrale antistoffen bieden slechts de eerste dagen bescherming aan het big, nadien zorgt de lactogene immuniteit voor de lokale bescherming in het lumen.

Rotavirus specifieke antilichamen in het colostrum (voornamelijk IgG's) en in de melk (voornamelijk secretorische IgA's) zorgen voor een passieve bescherming tegenover rotavirus infecties bij neonatale biggen. Secretorische IgA's bieden bij biggen een efficiënte bescherming ter hoogte van de darm gezien hun resistentie tegenover klieving door verteringsenzymen en hun hogere concentratie in melk. Hoge aanhoudende niveaus van passieve IgG's tegen het rotavirus sijpelen vanuit het serum terug in de darm en zorgen tijdelijk voor bescherming. Idealiter geraken zuigende biggen subklinisch geïnfecteerd met het rotavirus na het ontvangen van voldoende passieve antistoffen. Op deze manier worden klinische symptomen onderdrukt en ontwikkelen de biggen een actieve immuniteit⁶⁷.

3.2.7 Diagnose

Een diagnose van rotavirusdiarree kan gesteld worden met behulp van een laboratorium waarbij virus of virale antigenen in de mest worden opgespoord. Hiervoor kan men gebruik maken van ELISA, PCR of RT-qPCR. Voor deze testen dienen feces zo snel mogelijk na het ontstaan van de diarree verzameld te worden. Er is namelijk een hoge virusconcentratie nodig om een betrouwbaar resultaat te krijgen⁶⁸.

3.2.7.1 ELISA

ELISA of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay is een techniek waarbij heel specifiek eiwitten opgespoord kunnen worden op basis van antistof-antigen-interacties. Deze test wordt uitgevoerd in een microtiterplaat die eiwitten kan absorberen. Het eiwit waarin men geïnteresseerd is, wordt gedetecteerd met één of meerdere antilichamen, waarbij het detectie-antilichaam gemerkt is zodat visualisatie mogelijk is⁶⁹.

Bij een directe ELISA worden rotavirus-specifieke antilichamen gebonden aan een onoplosbaar drageroppervlak dat wordt gebruikt om rotavirus antigenen uit een staal te "vangen". Het gevormde complex wordt gedetecteerd door een met een enzym gemerkt antilichaam. De afbraak van het enzymsubstraat hangt af van de hoeveelheid rotavirus antigenen die aanwezig zijn in het staal⁷⁰. In routinematige diagnostische laboratoria wordt deze techniek het meest toegepast vanwege het gebruiksgemak en het snelle resultaat⁷¹.

⁶⁶ Andries (1998)

⁶⁷ Straw *et al.* (2006)

⁶⁸ Nauwynck (2012)

⁶⁹ Vanhee (2014)

⁷⁰ Ness *et al.* (1981)

⁷¹ Desselberger (2014)

3.2.7.2 PCR en RT-qPCR

De Polymerase Chain Reaction (PCR) is één van de krachtigste technologieën in de moleculaire biologie. Met behulp van PCR kunnen specifieke sequenties van een DNA of cDNA template vermenigvuldigd worden. Hiervoor gebruikt men sequentie specifieke oligonucleotiden ofwel primers, een hittestabiel DNA polymerase, nucleïnezuren en een buffer. Bij een gewone PCR gebeurt de detectie en kwantificatie van de geamplificeerde sequentie na de laatste PCR cyclus. Een post-PCR analyse zoals gelelektroforese is noodzakelijk. Bij een real-time kwantitatieve PCR (qPCR) wordt het PCR product tijdens elke cyclus gemeten. Door de reacties tijdens de exponentiële amplificatiefase op te volgen, kan de initiële targethoeveelheid met grote precisie bepaald worden. Theoretisch gezien zorgt de PCR voor een exponentiële vermeerdering van DNA, waarbij het aantal target moleculen bij elke vermeerderingscyclus verdubbeld. Bij real time PCR wordt de hoeveelheid DNA gemeten na elke cyclus door middel van fluorescente merkers. Dit levert een stijgend fluorescent signaal op dat in directe verhouding staat met het aantal amplicons (nieuw gevormd DNA) die gegenereerd worden en dus ook met de hoeveelheid startmateriaal⁷².

Elke cyclus van een PCR verloopt in drie stappen: denaturatie, primerbinding en elongatie. Tijdens de denaturatie gebeurt de incubatie bij hoge temperaturen om dubbelstrengig DNA (dsDNA) uit elkaar te doen gaan en enkelstrengig DNA (ssDNA) te vormen. Deze hoge temperatuur zorgt eveneens voor het losmaken van de secundaire structuren in ssDNA. Meestal gebeurt de denaturatie bij 95°C aangezien dit de hoogste temperatuur is waarbij het DNA polymerase stand houdt. Tijdens de primerbinding, of annealing (50-60°C), krijgen complementaire sequenties de kans om te hybridiseren. De elongatie gebeurt bij 70-72°C, aangezien op deze temperatuur het DNA polymerase optimaal werkt⁷³.

De PCR techniek is zeer gevoelig en specifiek en kan ook gebruikt worden voor genotypering. Puntmutaties zorgen voor een continue genomische drift waardoor primers die gebruikt worden voor genotypering periodiek moeten gewijzigd worden⁷⁴.

3.2.8 Behandeling

Er bestaat geen specifieke behandeling tegen rotavirusdiarree bij biggen. Het minimaliseren van warmteverlies en het verstrekken van voldoende water om de hydratatie te onderhouden, is aangewezen. Een warme, tochtvrije en droge omgeving kan samen met herhaalde kleine voederbeurten zorgen voor het voorkomen van uithongering, dehydratie en secundaire aandoeningen, zoals bacteriële infecties⁷⁵. Net zoals een griep, veroorzaakt door influenzavirus bij de mens, hebben antibiotica geen zin aangezien deze de virale replicatie niet kunnen remmen.

3.2.9 Preventie

Voor de bestrijding van rotavirus infecties kan men werken op meerdere vlakken. Het op peil houden van de lactogene immuniteit van de zeugen en het indijken van de infectiedruk in de kraamstal zijn al twee mogelijkheden. Tot op heden zijn er geen geregistreerde vaccins voor varkens voorhanden, waardoor men soms off-label gebruik maakt van geïnactiveerde bovine rotavaccins. Sommige varkenshouders brengen hun primipare zeugen in de tweede helft van de dracht regelmatig oraal in contact met feces van 3 tot 4 weken oude biggen, waarin praktisch altijd rotavirussen aanwezig zijn. Aangezien men op deze manier nooit exact weet wat er gegeven wordt aan de zeug, is deze strategie niet aan te raden. Het

⁷² Life Technologies (2014)

⁷³ Vanhee (2014)

⁷⁴ Desselberger (2014)

⁷⁵ Kahn *et al.* (2010)

werpen in gecompartmenteerde kraamhokken en het hanteren van een goede hygiëne en desinfectie zullen eveneens zorgen voor een gereduceerde infectiedruk⁷⁶.

Het spenen van biggen gaat gepaard met stress. Dit resulteert de eerste dagen na het spenen in een verminderde voederopname waardoor de verteringscapaciteit daalt. Een lage voederopname en het optreden van speendiarree hebben een negatieve impact op de groei van pas gespeende biggen. Om de voederopname en gezondheid na spenen te verbeteren kan men een aantal maatregelen nemen. Een van deze maatregelen is het toevoegen van specifieke substanties aan het voeder van gespeende biggen. Hiervoor gebruikt men onder andere gesproeidroogd plasma, dat meestal afkomstig is van varkensbloed (SDPP). Aan het bloed van slachtvarkens wordt een anticoagulans toegevoegd (bijvoorbeeld natriumcitraat), waarna de rode bloedcellen worden verwijderd door centrifugatie. Het plasma wordt vervolgens gesproeidroogd en kan gebruikt worden in de productie van humane voedingsmiddelen en diervoeders.

Na het spenen zorgt de overgang van zeugenmelk naar vast voeder voor belangrijke nutritionele veranderingen. Zo gebeurt er een omschakeling van vetten naar koolhydraten als voornaamste bron van verteerbare energie. Ook vindt er een omschakeling van goed verteerbaar dierlijk eiwit naar minder verteerbaar plantaardig eiwit plaats. Het toevoegen van SDPP, in plaats van plantaardige eiwitten, aan het voeder van gespeende biggen kan de prestaties na het spenen verbeteren. De aminozuursamenstelling en eiwitverteerbaarheid van SDPP is namelijk gelijkaardig aan de eiwitten aanwezig in zeugenmelk.

Pasgeboren biggen zijn afhankelijk van colostrum als enige bron van serum antistoffen. Gedurende de postnatale periode zorgt zeugenmelk voor de aanvoer van IgA antistoffen. Coffey en Cromwell stellen dat SDPP de immunocompetentie van biggen na het spenen kan verbeteren, door de aanwezigheid van immunoglobulinen in SDPP. De immunoglobulinen zouden kunnen voorkomen dat virussen en bacteriën de darmwand beschadigen. Er wordt eveneens verondersteld dat het voederen van SDPP het voorkomen of de gevolgen van speendiarree doet verminderen. Om deze hypothesen te staven zijn echter verdere experimenten *in vivo* aangewezen⁷⁷.

In de varkensindustrie wordt ook frequent gebruik gemaakt van antibiotica (veelal colistine) om diarree bij gespeende biggen te voorkomen. Om het overmatige antibioticagebruik in de intensieve varkenshouderij en de kans op antibioticaresistentie te verkleinen, wordt meer en meer gebruik gemaakt van zinkoxide in het speenvoeder van biggen. Onderzoek heeft aangetoond dat supplementatie van speenvoeder met zinkoxide gedurende korte tijd aan relatief hoge dosis (2500 ppm ZnO) stabiliserend werkt op het spijsverteringsstelsel en zo problemen met speendiarree kan reduceren of voorkomen⁷⁸. De exacte werkwijze is tot nu toe niet geweten⁷⁹. Hoge dosissen zorgen voor de modificatie van de intestinale microbiota en een gereduceerde vrijstelling van histamine door de dunne darm. Zinkoxide kan eveneens de integriteit van de intestinale mucosa verbeteren door de expressie van IGF 1 (Insuline Growth Factor 1) en zijn receptoren te stimuleren. Het herstel van schade, veroorzaakt door het gewijzigde dieet bij spenen, wordt hierdoor versneld. Sinds september 2013 is het tijdelijk toegelaten om 2500 ppm zinkoxide aan het voeder van pas gespeende biggen toe te voegen. Deze hoge dosis mag enkel toegediend worden gedurende de eerste 14 dagen na spenen en onder controle van een dierenarts⁷⁸.

⁷⁶ Nauwynck (2012)

⁷⁷ van Dijk *et al.* (2001)

⁷⁸ AMCRA vzw (2012)

⁷⁹ De Smet *et al.* (2014)

4 Materiaal en methoden

In het kader van dit eindwerk werden er twee varkensbedrijven bezocht om een longitudinale veldstudie uit te voeren. Om in aanmerking te komen voor deelname aan de studie, dienen de varkensbedrijven aan enkele vooraf bepaalde criteria te voldoen. Tijdens het eerste bezoek werd een anamnese afgenomen samen met een dierenarts, om de problematiek op het bedrijf te kaderen. Vervolgens werden er 10 biggen geselecteerd die tijdens deze studie werden opgevolgd. Tijdens elk bedrijfsbezoek werden er fecale swabs genomen om de eventuele virusuitscheiding van de biggen in kaart te kunnen brengen. Bacteriologische swabs werden geanalyseerd op de aanwezigheid van *E. coli*. Bij de biggen die tijdens de batterijfase werden opgevolgd, werd er aan het begin en einde van de studie bloed gecollecteerd om het antistofgehalte te bepalen.

4.1 Anamnese geselecteerde bedrijven

4.1.1 Bedrijf 1: kraamstalproblematiek

De bedrijfskengetallen worden weergegeven in Figuur 6. Dit bedrijf werkt volgens een 4 weken systeem met een speenleeftijd op 19 dagen. Hierdoor is de sanitaire leegstand in de kraamstal beperkt tot 1 dag. De gelten worden aangekocht en het vervangingspercentage bedraagt 40%. De mortaliteit in de kraamstal ligt relatief hoog en bedraagt 14,6%.

Aantal zeugen									380			Aantal gespeende biggen/zeug/jaar							31
Gebruikte wekensysteem									4	weken		Speenleeftijd							19,7
Gelten												Speengewicht (kg)							6
												Dagelijkse groei batterijfase (g/dag)							360
Vervangingspercentage zeugen									40			Aantal biggen/batterij unit							900
Aantal worpen/zeug/jaar									2,47			Sterfte % in de batterij							2 à 3
Totaal aantal geboren biggen per worp									16,11			Leeftijd verkochte biggen							7 weken
Aantal levend geboren biggen per worp									14,74			Gemiddeld gewicht verkochte biggen							23
Aantal doodgeboren/zwakke biggen per worp									1,37			Ras zeug							
Gemiddeld geboortegewicht (kg)									/			Topigs							(aankoop)
Sterfte % in de kraamstal									14,6			Pietrain							KI
																			Eigen

Fig. 6. Overzicht bedrijfskengetallen bedrijf 1

Gezondheidsproblemen in de kraamstal

In de kraamstalfase worden iedere ronde diarreeproblemen vastgesteld. Het gaat hier om pasteuze diarree ('mayonaise') die meestal optreedt in nesten van gelten. In de laatste zes maanden werden geen diagnoses uitgevoerd in het kader van kraamstaldiarrée. De gelten en zeugen worden gevaccineerd met Neocolipor ter preventie van *Escherichia coli*. Een andere vaccinatiestrategie die wordt toegepast, is het voederen van gelten met krantenknipsels gedrenkt in mest van biggen met diarree. Er worden geen bovine rotavirus vaccins gebruikt. Aan zuigende biggen met diarree dient men enrofloxacin (breedspectrum antibioticum) en elektrolytenoplossing toe. Ook lampen en schadelingen worden voorzien om de biggen te ondersteunen bij diarree en onderkoeling te voorkomen.

In de kraamstal maakt men gebruik van een melkbar om de biggen te supplementeren met een babybiggenvoeder. Andere gezondheidsproblemen die optreden in de kraamstal zijn het porcien respiratoir en reproductief syndroom virus (PRRSv) en *Streptococcus suis* infecties.

Gezondheidsproblemen in de batterij

Volgens de veehouder treden hier bijna nooit diarreeproblemen op. De laatste zes maanden werden er geen diagnostische mestonderzoeken uitgevoerd. Vanaf 3 dagen voor het spenen tot 2 weken na het spenen wordt er speenvoeder met plasma verstrekt. Na het spenen wordt er eveneens gedurende 10-14 dagen zinkoxide aan het voeder toegevoegd. Er wordt geen colistine antibiotica gebruikt ter preventie van diarreeproblemen. In de batterij ziet men soms problemen met *Mycoplasma hyopneumoniae*, het circovirus (hiertegen wordt wel gevaccineerd) en PRRSv.

Reiniging en desinfectie

Op dit bedrijf wordt er enkel gedesinfecteerd met Virocid (CID LINES). Tussen twee productierondes door is er geen leegstand van de stal mogelijk. Eén kant van de kraamstal kan volledig opdrogen vooraleer de zeugen erin gaan, aangezien men hier 's nachts de ventilatie opzet. De andere kant is niet droog vooraleer de zeugen worden verplaatst. De reiniging gebeurt enkel met water, er wordt dus geen reinigingsmiddel gebruikt.

Voeder- en vaccinatiestrategie bij de biggen

Gedurende de gehele kraamstalperiode wordt er Babymilk bijgegeven in de kraamhokken. Vanaf een leeftijd van vijf dagen krijgen de biggen Porci precoe plasma bijgevoerd tot drie dagen voor het spenen, waarna het vervangen wordt Porci V Speen Plasma.

Op een leeftijd van vier dagen worden alle biggen gevaccineerd met Vetrinox tegen bacteriële ademhalingsinfecties met *Pasteurella multocida* en *Actinobacillus pleuropneumoniae* en systemische *Streptococcus suis* infecties. Tabel 3 geeft een overzicht van de toegepaste voederstrategie.

Tabel 3. Voederstrategie biggen kraamstal

Leeftijd	Product	Medicatie
Dag 1 tot spenen	Babymilk	Plasma
Dag 5 tot 3D voor spenen	Porci precoe plasma (Dumoulin)	Plasma
Vanaf 3D voor spenen	Porci V Speen Plasma	Plasma

4.1.2 Bedrijf 2: problematiek in de biggenbatterij

De bedrijfskengetallen worden weergegeven in Figuur 7. Dit bedrijf werkt volgens een 4 weken systeem met een speenleeftijd op 19 dagen. Hierdoor is de sanitaire leegstand in de kraamstal beperkt tot 1 dag. De gelten zijn afkomstig van eigen productie en het vervangingspercentage bedraagt 30-35%. De mortaliteit in de kraamstal is relatief hoog met 15,4%. De meeste problemen stelt de veehouder echter vast in de biggenbatterij.

Aantal zeugen	535	Aantal gespeende biggen/zeug/jaar	12,64
Gebruikt systeem	4 weken	Speenleeftijd	19,13
Gelten ☒ eigen productie ☐ aankoop		Speengewicht (kg)	5,03
Vervangingspercentage zeugen	30-35%	Dagelijkse groei batterijfase (g/dag)	/
Aantal worpen/zeug/jaar	3	Aantal biggen/batterijunit	1200 per groep /ong 100 per afdeling
Totaal aantal geboren biggen per worp	16,79	Sterfte % in de batterij	1,5% met medicatie, zonder 8-10%
Aantal levend geboren biggen per worp	14,9	Leeftijd verkochte biggen	9w en 10w
Aantal doodgeboren/zwakke biggen per worp	1,89	Gemiddeld gewicht verkochte biggen	25-26 kg
Gemiddeld geboortegewicht (kg)	1,2	Ras zeug	Danbred
Sterfte % in de kraamstal	15,4%	Ras beer	GFT-2 ☒ KI ☐ Eigen

Fig. 7. Overzicht bedrijfskengetallen bedrijf 2

Gezondheidsproblemen in de kraamstal

Hier worden er weinig problemen vastgesteld door de veehouder en men ziet bijna nooit diarree bij de zuigende biggen. Indien er diarree optreedt, is dit meestal in de nesten van gelten. In de laatste 6 maanden werden geen diagnoses uitgevoerd in het kader van kraamstaldiarrée. De gelten en zeugen worden gevaccineerd met Suiseng (Hipra Lab) ter preventie van bacteriële neonatale diarree veroorzaakt door *Escherichia coli* & *Clostridium perfringens*. Er worden geen boviene rotavirus vaccins gebruikt. Promycine (colistine) wordt toegevoegd aan de kunstmelk bij diarree. Andere problemen die vaak voorkomen zijn *Streptococcus suis* infecties en het doodliggen van de biggen kort na de partus.

Gezondheidsproblemen in de batterij

Volgens de veehouder waren hier de meeste problemen. Wanneer het voeder gemedicineerd wordt, bedraagt de mortaliteit 1,5% terwijl dit kan oplopen tot 10% zonder voedermedicatie. Iedere ronde worden er waterige diarreeproblemen gezien, die beter onder controle gehouden worden bij gebruik van antibiotica. Er werden in de laatste 6 maanden geen diagnoses uitgevoerd om een etiologische oorzaak van het probleem te identificeren. De gespeende biggen worden gevaccineerd met Ecoporc Shiga (IDT Biologika), om bescherming te bieden tegen de Stx2e toxines van F18⁺ toxine-producerende *E. coli*. Deze toxines zorgen in de bloedbaan voor letsels waardoor vocht kan uittreden, hetgeen oedeem veroorzaakt ("oedeembiggen"). Deze vaccinatie beschermt echter niet tegen speendiarree veroorzaakt door F18⁺ *E. coli*. Zinkoxide (Zincochem, 14 dagen) en colistine (Promycine, 14 dagen) worden aan het speenvoeder toegevoegd om diarreeproblemen te voorkomen. *Streptococcus suis* infecties vormen ook een probleem bij de gespeende biggen, hiervoor wordt profylactisch amoxicilline (Dokamox, Sogeval) aangewend in het voeder.

Reiniging en desinfectie

Er wordt op dit bedrijf enkel gereinigd met Mega Foam Cleaner (Nerta). Er wordt geen desinfectiestap meer toegepast, aangezien de veehouder geen prestatieverschil waarneemt wanneer de desinfectie wel of niet wordt toegepast. Ook zijn er getuigenissen van collega veehouders die goede resultaten boeken zonder desinfectie. De beperkte tijd om de desinfectie te kunnen toepassen speelt ook een rol. Op maandag wordt er gespeend en dinsdag gaat de volgende groep zeugen in de kraamstal. Ook in de batterijen is er een beperkte leegstand. De stal is nooit volledig droog vooraleer de volgende ronde wordt opgestart.

Voederstrategie bij de gespeende biggen

Na het spenen wordt Precoce B plasma gevoederd. Eén dag na het spenen wordt de brijvoeder installatie opgestart. Eerst wordt er Speenstarter gevoederd dat gemedicineerd is met amoxicilline en gesupplementeerd met zinkoxide. Daarna wordt er overgeschakeld op Baby Groeistarter GTI F3 met amoxicilline. Amoxicilline wordt aangewend om *Streptococcus suis* infecties te controleren.

Tabel 4. Voederstrategie na spenen

Leeftijd	Product	Medicatie
Dag 0 tot 1 na spenen	Precoce B plasma (Trouw)	Plasma Amoxicilline
Eerste 2 weken na spenen	Speenstarter GTI F2 (Scherrens)	Amoxicilline Zinkoxide
Rest van de batterijperiode	Baby Groeistarter GTI F3	Amoxicilline

4.2 Studieprotocol

4.2.1 Bedrijf 1: kraamstal

Op het bedrijf werden 10 biggen (A tot en met J) geselecteerd voor longitudinale opvolging op dag 1 na de partus. Per nest werden 2 biggen uitgekozen bij 5 zeugen met verschillende pariteiten. De zwaarste en lichtste biggen en nesten met minder dan 8 biggen werden uitgesloten. Zowel op dag 1 als op dag 19 worden de biggen gewogen. Iedere 2 dagen (gedurende de eerste 11 dagen) en vervolgens elke 4 dagen, werd het bedrijf bezocht om rectale swabs te collecteren van ieder big. Eén swab werd gebruikt voor virologisch onderzoek aan het Laboratorium voor Virologie voor de bepaling van het aantal kopieën groep A en C rotavirussen aanwezig per gram mest. Op de piek van uitscheiding van iedere rotavirusstam werd ook een stamtypering uitgevoerd door middel van sequencerings volgens methoden geoptimaliseerd in het Labo Virologie (Theuns et al., 2014; Theuns et al., 2015).

De methoden hiervoor worden verder meer in detail toegelicht. Een tweede swab werd gebruikt voor bacteriologisch onderzoek door Dialab om *E. coli* te isoleren. Hierbij werd een onderscheid gemaakt tussen niet-hemolytische en hemolytische kolonies. Er werd een fecale score (3 - normaal tot 0 - waterig) toegekend aan ieder big op ieder tijdstip. Een score lager dan 2 wordt aanzien als diarree.

De oriëntatie van de biggen in de kraamstal wordt weergegeven in Figuur 8. Big D stierf op de eerste dag van het onderzoek.

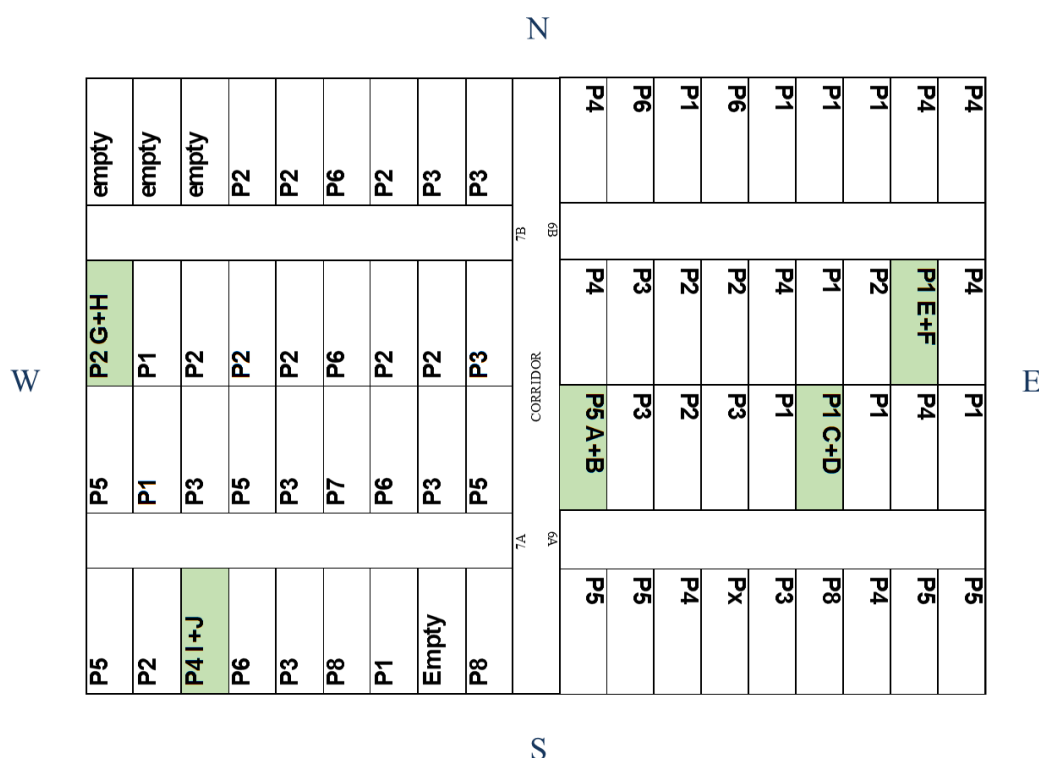


Fig. 8. Locatie geselecteerde biggen in de kraamstal (A-J). P geeft de pariteit van de moederdieren weer.

4.2.2 Bedrijf 2: biggenbatterij

Ook hier werd het bedrijf bezocht om 10 biggen (A tot en met J) te selecteren volgens dezelfde criteria. De selectie werd 3 dagen voor het spenen gemaakt, zodat de afkomst van de biggen gekend was. De biggen werden gespeend op dag 0 van de studie en één dag na het spenen werd de longitudinale opvolging daadwerkelijk gestart. Op dag 1 en 43 werden de biggen gewogen en werd er bloed gecollecteerd om de IgG antistoffenconcentratie tegenover het rotavirus in het bloed te bepalen. Iedere 2 dagen (gedurende de eerste twee weken) en vervolgens elke 4 dagen, werd het bedrijf bezocht om rectale swabs te collecteren. Er werd een diarreescore (7 - droog en welgevormd tot 1 - bloederig) toegekend aan ieder big op ieder tijdstip. Een score van <6 wordt aanzien als platte mest en een score lager dan 5 wordt aanzien als diarree.



Fig. 9. Fecaal scoresysteem biggenbatterij. V.l.n.r.: droog (score 7) tot bloederig (score 1)⁸⁰

De locatie van de biggen in de batterij units is weergegeven in Figuur 10. Big B werd door de veehouder op dag 8 van de studie verplaatst van afdeling 5 naar afdeling 11 (samen met alle zwakkere biggen, deze afdeling kreeg extra droogvoer). Op dag 18 van de studie werden biggen A, I en J verhuisd van afdeling 7 naar afdeling 11.

Gang												
Unit 1	Unit 2	Unit 3	Unit 4	Unit 5	Unit 6	CV	Unit 7	Unit 8	Unit 9	Unit 10	Unit 11	Unit 12
Overige biggen	Overige biggen	Overige biggen	Overige biggen	B C E F	Overige biggen		A I J	D	G H	Voorgespeende biggen	Leeg	Leeg

Fig. 10. Locatie van de biggen in de batterij units

4.3 Klinische opvolging van de biggen

Tijdens het studieverloop werden de geselecteerde biggen telkens visueel beoordeeld. Zien de biggen er gezond uit, hoesten of niezen ze, beschikken ze over een goede body condition score, vertonen ze enige verwondingen,...? Aan de veehouders werd gevraagd openlijk te communiceren indien er moederdieren van geselecteerde biggen in de kraamstal of de geselecteerde biggen zelf een behandeling ondergingen. Hetzelfde gold in de biggenbatterij waar in afdelingen met geselecteerde biggen een behandeling met geneesmiddelen werd ingesteld.

4.4 Kwantificatie van de rotavirus uitscheiding

De swabs (Copan), bestemd voor virologisch onderzoek, worden zowel voor als na de staalname gewogen. Bij aankomst op het laboratorium wordt 1 mL MEM (Gibco) aan de collectietubes toegevoegd, waarna deze voor 30 minuten bij 4°C op een schudder gezet worden om viruspartikels van de watten swab vrij te stellen. De fecale suspensie wordt nadien in 1,5 mL eppendorfs overgebracht en bewaard bij -70°C. Vanuit 200 µL gecollecteerde mestsuspensie per staal kan viraal RNA geëxtraheerd worden met behulp van de QIAamp Cador Pathogen Mini Kit (Qiagen) volgens de instructies van de fabrikant. Naast de stalen wordt er ook een extractiecontrole met MEM ingesloten om mogelijke contaminatie tijdens de extractieprocedure te kunnen beoordelen. Het geëluëerde RNA wordt nadien bewaard bij -70°C. De aanwezigheid van groep A en C rotavirussen werd gekwantificeerd met RT-qPCR. Hiervoor wordt het RNA eerst gedenateerd bij 95°C gedurende 2 minuten en nadien direct op ijs gezet. De gebruikte reactiemix (20 µL per reactie) voor de RT-qPCR van RVA bestaat uit 10 µL Precision OneStep qRT-PCR Mastermix met SYBR Green, ROX en Inert blue pipeting dye (Primerdesign, Southampton,

Verenigd Koninkrijk), 400 nM (0,8 µL) forward primer (Integrated DNA Technologies, IOWA, VSA), 50 nM (0,1 µL) reverse primer (IDT), 6.1 µL nuclease vrij water en 3 µL template RNA. Voor RVC bestaat de gebruikte reactiemix (20 µL per reactie) uit 10 µL Precision OneStep qRT-PCR Mastermix met SYBR Green, ROX en Inert blue pipeting dye (Primerdesign, Southampton, Verenigd Koninkrijk), 200 nM (0,4 µL) forward primer (Integrated DNA Technologies, IOWA, VSA), 50 nM (0,1 µL) reverse primer (IDT), 6.5 µL nuclease vrij water en 3 µL template RNA. Als negatieve RT-qPCR controle wordt er nuclease vrij water gebruikt. Voor de standaardcurve wordt gebruik gemaakt van tienvoudige serieverduunningen van standaard RNA met een bereik van 5 log₁₀ tot 1 log₁₀ kopieën/reactie in tweevoud. Voor rotavirus A wordt standaard RNA gebruikt van een stuk van het porcine NSP5 gen (331 baseparen), voor groep C rotavirus is dit een stuk van het VP6 gen (94 baseparen). De reactiemix wordt in Brightwhite 96-well qPCR platen (Primerdesign) verdeeld. De reactiecondities zijn 55°C voor 10 minuten, 95°C voor 8 minuten, 40 amplificatiecycli (95°C voor 10 seconden en 60°C of 56°C gedurende 60 seconden voor respectievelijk RVA en RVC), gevolgd door een smeltcurve analyse. Stalen worden geanalyseerd in een ABI StepOnePlus qPCR apparaat (Applied Biosystems). De baseline en threshold worden respectievelijk automatisch en manueel ingesteld. Rekening houdend met het gewicht van de gecollecteerde mest, kan het aantal RVA of RVC kopieën/g feces berekend worden voor elk big op elk tijdstip. Een staal wordt positief beschouwd als er een specifieke amplificatie wordt waargenomen in beide herhalingen. Stalen zijn kwantificeerbaar als de Cq waarde onder de Cq waarde van de 1 log₁₀ verduunning van de standaardcurve ligt. Cq waarden boven deze 1 log₁₀ verduunning, worden als positief beschouwd, maar zijn niet kwantificeerbaar (onder limiet van kwantificatie), indien eveneens specifieke amplificatie wordt waargenomen in beide herhalingen van het staal⁸¹.

Om de virale uitscheiding van twee verschillende virale infecties bij eenzelfde big te vergelijken, wordt de oppervlakte onder de curve (AUC) berekend. Voor elke individuele infectie wordt het aantal RNA kopieën per gram op het moment van de virale piekuitscheiding (t_{max}) en de virale ladingen op het tijdstip voor en na de t_{max} berekend met behulp van trapezoiden. De AUC voor elke trapezoid wordt berekend aan de hand van volgende formule: $((y_1+y_2)/2)*(t_2-t_1)$ in Excel (Microsoft). Voor deze analyse worden niet log getransformeerde virale ladingen (kopieën/g) gebruikt. Een Wilcoxon matched-pairs signed rank test werd gebruikt om het verschil te analyseren tussen de twee infectiegolven bij alle dieren. Een p-waarde lager dan 0,05 wordt als significant beschouwd. Verder wordt er een Spearman's correlatie onderzocht tussen de ernst van een virale replicatie, de dagelijkse groei en het speengewicht⁸¹.

4.5 Stamtypering rotavirus

RVA en RVC stammen die circuleren op de onderzochte varkensbedrijven worden gekarakteriseerd via sequenceren van partiële VP7 en VP4 coderende genen. Hiervoor wordt het geëxtraheerde RNA uit de fecale swabs, gecollecteerd op de piek van virale uitscheiding, gebruikt. RNA wordt eerst gedenateerd op 95°C gedurende 2 minuten en nadien op ijs gezet. Voor de amplificatie van de partiële genen wordt de Qiagen Onestep RT-PCR Kit (Qiagen) gebruikt. De gebruikte primersets voor RVA zijn Beg9/End9 (Gouvea *et al.*, 1990) of Gen_VP7F/Gen_VP7R (Iturriza-Gomara *et al.*, 2009) voor VP7 en VP4_1-17F (Gentsch *et al.*, 1992)/VP4R_Deg (Theuns *et al.*, 2014) of VP4F (Iturriza-Gomara *et al.*, 2009)/VP4R_Deg voor VP4. De gebruikte primerset voor RVC is RVC_VP7-20F/RVC_VP7-1062R (Rahman *et al.*, 2005) voor VP7 en RVC_VP4-17F/RVC_VP4-1238R (Rahman *et al.*, 2005) voor VP4. Elke reactie (25 µL) bestaat uit 5 µL QIAGEN OneStep RT-PCR buffer, 1 µL dNTP mix, 1 µL QIAGEN OneStep-RT-PCR enzymemix, 3 µL forward en reverse primer, 7 µL nuclease vrij water en 5 µL RNA template. Reactiecondities zijn als volgt: 50°C voor 30 minuten, 95°C voor 15 minuten, 35 cycli (94°C voor 30 seconden, 50°C voor 30 seconden

⁸¹ Theuns (2015)

en 72°C voor 2 minuten), gevolgd door een laatste elongatiestap van 10 minuten aan 72°C. Nadien wordt er 5 µL van het PCR product gemengd met 1 µL ladingsbuffer en geladen op een polyacrylamidegel van 1,5%. Dit wordt gevolgd door elektroforese op 100 mV gedurende 30 minuten, waarna er een ethidiumbromide kleuring wordt uitgevoerd op de gel ter detectie van positieve stalen. Van elk positief PCR product wordt er 20 µL gebruikt voor opzuivering van het staal (Macherey-Nagel). GATC-biotech voert op dit opgezuiverd staal een Sanger sequencer uit met behulp van de gebruikte forward primer. De bekomen chromatogrammen worden geanalyseerd aan de hand van 4Peaks software en de basic local assignment search tool (BLAST). De genotypes voor RVA worden bepaald door middel van de online webtool RotaC^{2.0} en BLAST. De VP7 en VP4 genotypes voor RVC worden bepaald door de sequenties te vergelijken met deze die aanwezig zijn in GenBank door middel van BLAST⁸².

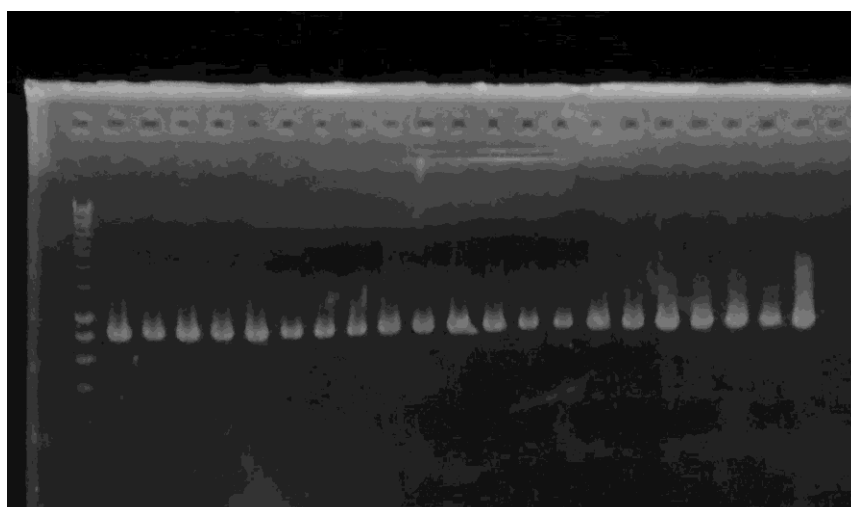


Fig. 11. 1,5% agarosegel na ethidiumbromide behandeling ter detectie van RVA VP4 coderende genen. De negatieve controle situeert zich ter hoogte van het laatste laantje aan de rechterkant, de positieve controle bevindt zich in het laantje daarvoor. Alle stalen op deze gel zijn positief.

4.6 Serum rotavirus-specifieke IgG antistoffenbepaling

Bij biggen die worden opgevolgd in de biggenbatterij (bedrijf 2) wordt er op de eerste en laatste dag van de studie veneus bloed uit de vena jugularis verzameld. Dit bloed wordt getest op aanwezigheid en concentratie van IgG en IgA antistoffen tegenover rotavirussen. De *in house* immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) wordt uitgevoerd op Marc cellen die werden geïnoculeerd met 10.000 TCID₅₀/well van een G5P[7] rotavirusstam. Het verzamelde bloed wordt afgedraaid aan 4000 rpm gedurende 10 minuten bij 4°C. Hierna worden de sera behandeld voor 30 minuten aan 56°C om complement te inactiveren, waarna de stalen bij -70°C ingevroren kunnen worden tot aan de IPMA. Voor de IPMA uit te voeren, dienen de Marc cel platen op kamertemperatuur te komen. Cellen worden gefixeerd met 4% paraformaldehyde (100 µL per well gedurende 10 minuten laten incuberen op kamertemperatuur). De platen worden nadien driemaal gewassen met PBS voor 5 minuten en vervolgens worden de cellen gepermeabiliseerd met methanol en H₂O₂ om endogene peroxidasen te blokkeren. Na het aanmaken van de serumverduunningen (1/40 en vervolgens 1 op 2) kan er 50 µL per well overgepipetteerd worden naar de Marc celplaten. Hierna vindt er een incubatiestap plaats en worden de afgedichte platen gedurende 1 uur geïncubeerd bij 37°C. De platen worden vervolgens gewassen met 100 µL wasvloeistof per well (PBS + 1% Tween80), waarna het secundair antilichaam (goat anti swine IgG) wordt opgebracht (50 µL per well). Dit secundair antilichaam wordt eerst 1/500 verdunt in verdunningsbuffer. Het secundair antilichaam wordt gedurende 1 uur geïncubeerd bij 37°C in de afgedichte plaat, waarna een wasstap met PBS plaats vindt (3 keer gedurende 5 minuten). Na deze wasstap

⁸² Theuns (2015)

wordt het substraat (NaAcetaat + AEC + H₂O₂) toegevoegd aan een concentratie van 50 µL per well. Tijdens de incubatiestap van 10 minuten kan de plaat gecontroleerd worden op verkleuring, waarna het substraat wordt afgenomen en er 100 µL NaAcetaat per well wordt opgezet om de reactie te stoppen. De platen kunnen nu afgelezen worden met een lichtmicroscop om geïnfecteerde cellen te visualiseren⁸³.

4.7 Isoleren van *Escherichia coli* en typering

De swabs die worden genomen voor de bacteriologische isolatie van *E. coli* worden door het private laboratorium Dialab onderzocht. Na de isolatie van niet-hemolytische of hemolytische *E. coli* worden de agarplaten in het Laboratorium Virologie bewaard bij 4°C tot aan de typering. Met behulp van een qPCR zullen individuele kolonies getest worden op de aanwezigheid van F4⁺ en/of F18⁺ fimbriae. Stalen genomen in de kraamstal worden getest op F4⁺ *E. coli*, terwijl deze uit de batterij zowel getest worden op F4⁺ als F18⁺ *E. coli*.

Per te testen staal, wordt er 1 duidelijke kolonie van de agarplaat opgepikt en opgelost in 50 µL UP water. Het bacterieel DNA uit *E. coli* kan vrijgesteld worden door middel van verhitting aan 95°C gedurende 10 minuten. Er is dus geen DNA extractie van de stalen nodig. De gebruikte reactiemix (20 µL per reactie) voor de RT-qPCR van F4⁺ *E. coli* bestaat uit 10 µL Precision 2x qPCR Mastermix (Primerdesign), 50 nM (0.1 µL) forward primer F4⁺, 400 nM (0.8 µL) reverse primer F4⁺, 6.1 µL nuclease vrij water en 3 µL template RNA. Voor de RT-qPCR van F18⁺ *E. coli* (reactiemix van 20 µL per reactie) maakt men gebruik van 10 µL Precision 2x qPCR Mastermix (Primerdesign), 400 nM (0.8 µL) forward primer F18⁺, 50 nM (0.1 µL) reverse primer F18⁺, 6.1 µL nuclease vrij water en 3 µL template RNA. Nuclease vrij water wordt gebruikt als negatieve RT-qPCR controle. De reactiemix wordt in Brightwhite 96-well qPCR platen (Primerdesign) gepipetteerd. Reactiecondities zijn 10 minuten aan 95°C, gevolgd door 40 cycli (95°C gedurende 15 seconden, 56°C en 60°C voor 60 seconden en detectie voor respectievelijk F4⁺ en F18⁺) en een smeltcurve analyse. Stalen worden geanalyseerd in een ABI StepOnePlus qPCR apparaat (Applied Biosystems).

⁸³ Theuns (2015)

5 Resultaten

5.1 Bedrijf 1: kraamstal

5.1.1 Biggeninformatie en gewichtsevolutie

De gegevens van de geselecteerde biggen en hun gewichten aan het begin en einde van de studie worden weergegeven in Tabel 5. In totaal waren er 4 biggen afkomstig van gelten (C, D, E en F). Het gemiddelde geboortegewicht (op dag 1 na partus) van de 10 biggen bedroeg 1,52 kg. De veehouder voert geen routinematige screening van het geboortegewicht uit, zodat vergelijking met andere rondes niet mogelijk is. Op zich is dit een goed gemiddeld geboortegewicht.

De gemiddelde dagelijkse groei van de geselecteerde biggen was goed, met een gemiddelde gewichtstoename van 238 gram per dag. De slechtste groei wordt gezien bij big C (194 g/dag), G (200 g/dag) en H (175 g/dag). Big C is afkomstig van een gelt, maar de pariteit lijkt weinig invloed te hebben, aangezien de biggen E (250 g/dag) en F (239 g/dag) ook afkomstig waren van een gelt maar wel goed groeiden. Er kan wel een invloed geweest zijn van de nestgrootte en de pariteit tezamen.

Het gemiddelde gewicht op dag 19 bedroeg 5.76 kg, hetgeen net onder het gemiddeld speengewicht van het bedrijf ligt (6kg). Het betreft hier uiteraard een beperkte steekproefgrootte en idealiter zouden er meer nesten gewogen moeten worden om hieruit definitieve conclusies te kunnen trekken. Het eindgewicht van biggen C, G en H lag lager en ook de dagelijkse groei was sterk gereduceerd ten opzichte van de andere biggen.

Tabel 5. Informatie geselecteerde biggen bedrijf 1

Big	Zeug n°	Pariteit	Worp grootte (levend)	Geslacht	Gewicht (kg)		Dag. groei (g)
					Begin (kg) (dag 1)	Einde (dag 19)	
A	2488	5	18	M	1,2	6,5	294
B				V	1,5	6,4	272
C	2734	1	17	V	1,3	4,8	194
D				M	1,6	gestorven op dag 1	
E	2714	1	15	M	1,3	5,8	250
F				M	1,5	5,8	239
G	6323	2	9	V	1,7	5,3	200
H				M	1,8*	4,6	175
I	3142	4	12	V	1,8	6,6	267
J				M	1,5	6	250
GEMIDDELD					1,52	5,76	238

* Gewicht bepaald op dag 3

5.1.2 Diarree score

Op elk moment van staalname werd er aan elk big een mestscore toegekend: 3 (normaal) tot 0 (waterig). Een score lager dan 2 wordt aanzien als diarree. Enkel op dag 14 en 17 werd er bij biggen G en H diarree vastgesteld.

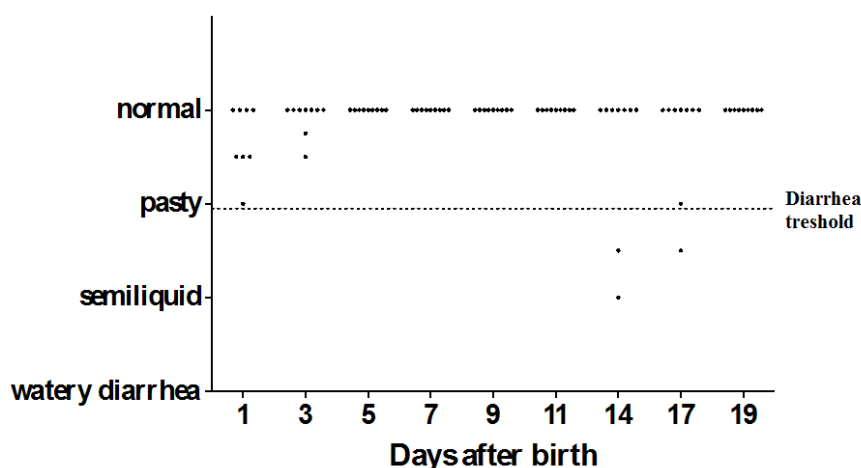
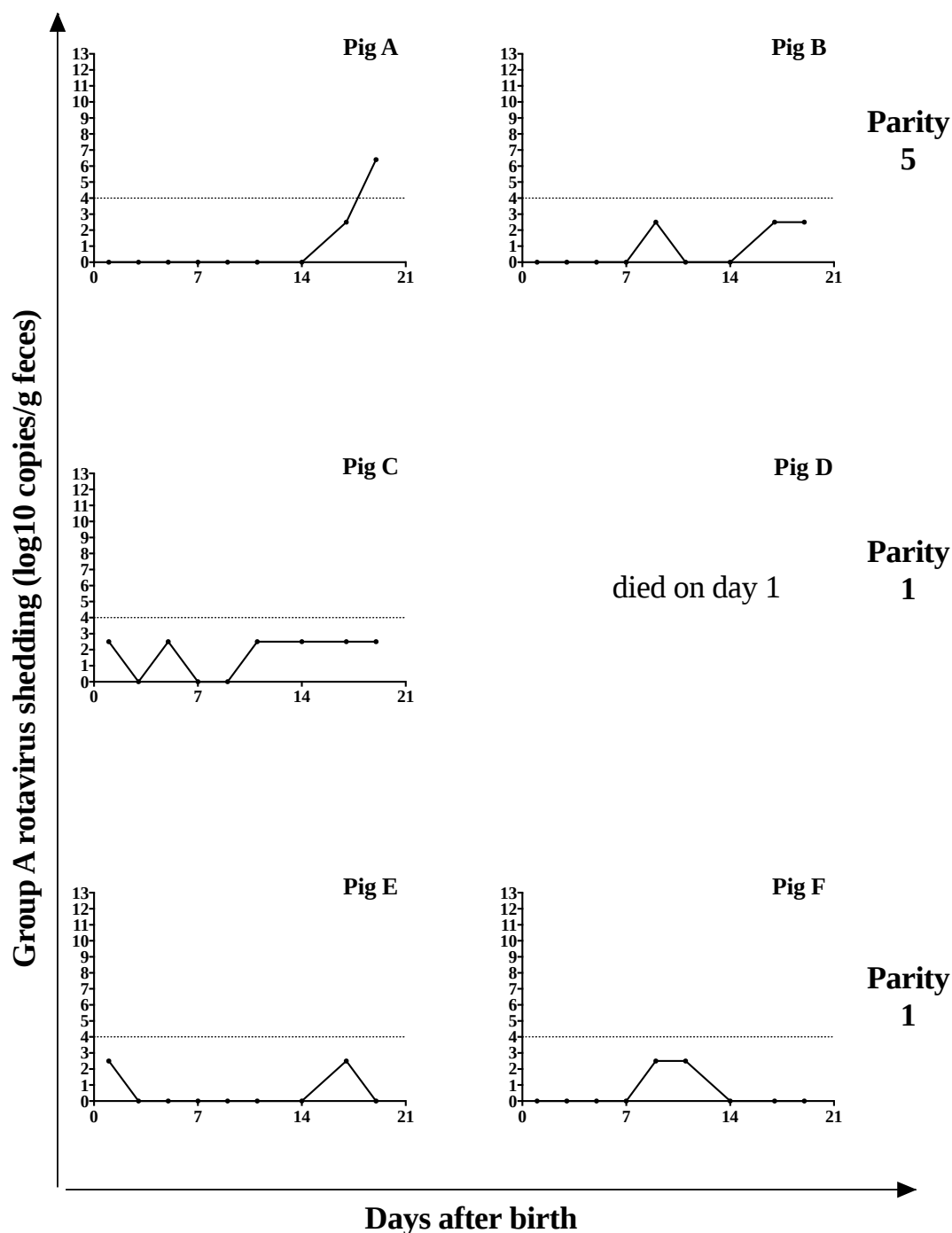


Fig. 12. Toegekende mestscores gedurende studieopvolging in kraamstal

5.1.3 Fecale uitscheiding van groep A en C rotavirussen

De uitscheiding van groep A rotavirussen in de mest werd vastgesteld voor de verschillende tijdstippen en de verschillende biggen. De kinetieken van virusuitscheiding zijn weergegeven in grafiek 1a en 1b. Stammen op het hoogtepunt van de uitscheiding werden genetisch bepaald om een stamtypering mogelijk te maken.

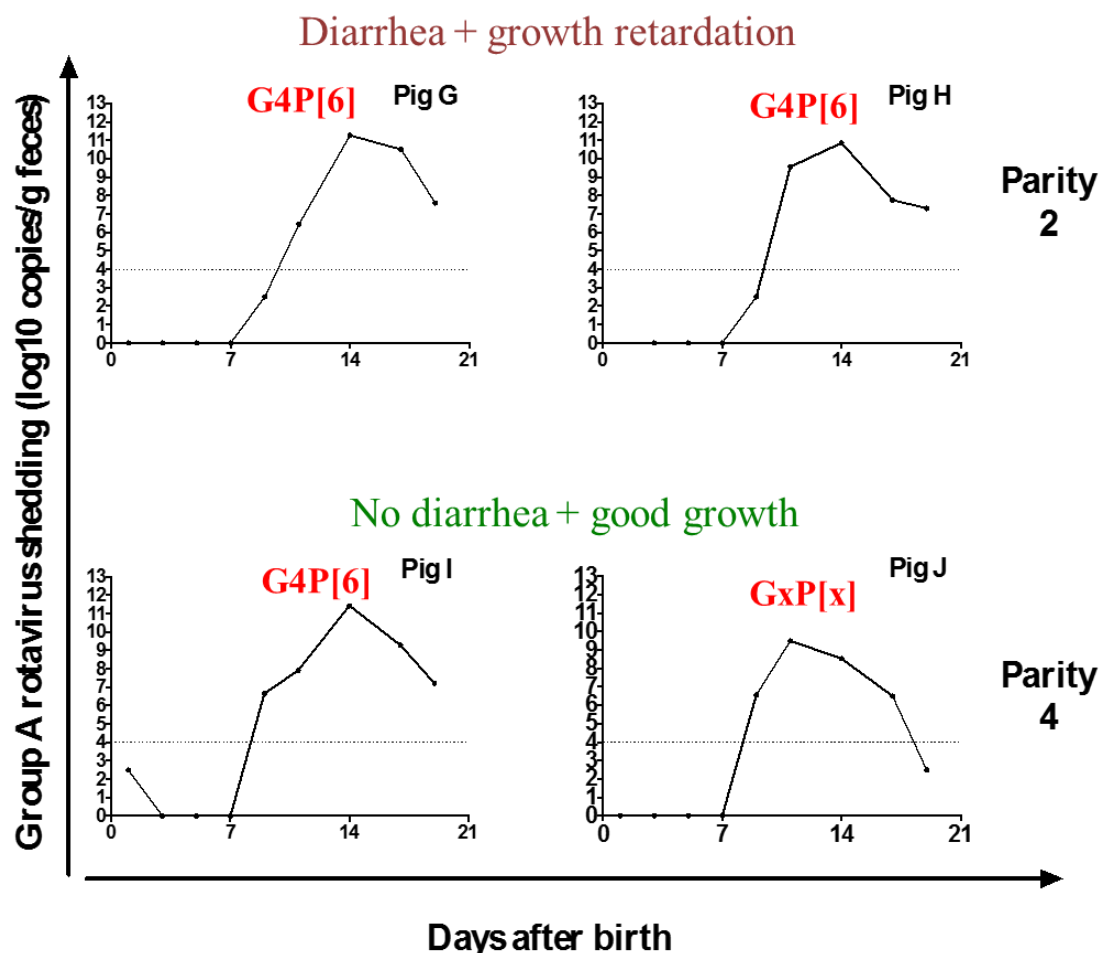
Grafiek 1a geeft een overzicht van de virusuitscheiding van de biggen uit het eerste compartiment. Van de zes geselecteerde biggen brak er enkel bij big A een rotavirus A infectie door op dag 19 van de studie, zonder diarreesymptomen. Bij de overige biggen werden op bepaalde tijdstippen zeer lage virusuitscheidingen waargenomen, doch kunnen deze biggen als negatief beschouwd worden.



Grafiek 1a. Uitscheiding RVA in de mest van geselecteerde biggen uit het eerste compartiment

Voor de 4 geselecteerde biggen (G, H, I en J) uit het tweede compartiment kon een hoge virusuitscheiding gedetecteerd worden met een hoogtepunt rond de leeftijd van 14 dagen. Dit wordt weergegeven in grafiek 1b. Biggen G en H vertoonden zowel diarree als groeivertraging. Biggen I en J vertoonden geen diarree en hadden ook geen groeiachterstand. Het verschil tussen deze twee nesten zou verklaard kunnen worden door de locatie van de nesten. Biggen G en H lagen vlak tegen de westelijke muur van het gebouw, waar weinig zon komt en vlak ernaast stond een koeienstal die zorgde voor schaduw. Bovendien waren de kraamnesten tegenover dit nest leeg, waardoor er minder lichaamswarmte van omliggende zeugen werd vrijgesteld. Hierdoor kon de temperatuur ter hoogte van dit kraamhok lager zijn dan dit van andere nesten en de biggen vatbaarder

gemaakt hebben voor problemen. Typering toonde aan dat de infectie werd veroorzaakt door een G4P[6] stam, die frequent voorkomt bij varkens.



Grafiek 1b. Uitscheiding RVA in de mest van geselecteerde biggen uit het tweede compartiment

Bij de geselecteerde biggen uit het bedrijf werden er geen rotavirus C infecties vastgesteld.

5.1.4 *E. coli* detectie en typering

Op het Laboratorium voor Virologie werden per studieweek 3 aërobe culturen uitgekozen waarop meer dan 30 kolonies van hemolytische of niet-hemolytische *E. coli* groeiden. Uit elke geselecteerde cultuur werd 1 zuivere kolonie opgepikt om met behulp van een RT-qPCR te testen op de aanwezigheid van F4⁺ of F18⁺ fimbriae.

Tabel 6 geeft een overzicht van de bacteriologie per tijdstip en per big. Op de meeste tijdstippen kon bij alle biggen niet-hemolytische *E. coli* geïsoleerd worden. In de meeste gevallen veroorzaakt niet-hemolytische *E. coli* geen ziekte, maar in ongeveer 12% van de gevallen kunnen deze wel ziekte veroorzaken⁸⁴. Op een aantal tijdstippen en bij dezelfde drie biggen kon ook hemolytische *E. coli* geïsoleerd worden. Dit is over het algemeen de ziekteverwekkende variant van *E. coli*, maar ook hier geldt dat niet alle hemolytische *E. coli* ziekte veroorzaken. Bij beide biggen met diarree (G en H) werd geen hemolytische *E. coli* vastgesteld. Bij big I trad er na de piek van rotavirus A uitscheiding een verschuiving van een niet-hemolytische naar een hemolytische flora op. Er werd bij dit big evenwel geen diarree opgemerkt. Op een aantal niet-hemolytische en hemolytische *E. coli* culturen werd een real-

⁸⁴ Frydendahl (2002)

time PCR uitgevoerd om genen voor F4⁺ fimbriae te detecteren, maar deze konden niet aangetoond worden.

Tabel 6. Bacteriologie geselecteerde biggen in de kraamstal

Big	Tijdstippen staalname								
	1	3	5	7	9	11	14	17	19
A									
B									
C									
E									
F									
G									
H									
I									
J									

5.2 Bedrijf 2: biggenbatterij

5.2.1 Biggeninformatie en gewichtsevolutie

De gegevens van de geselecteerde biggen en hun gewichten aan het begin en einde van de studie worden weergegeven in Tabel 7. In totaal waren er 4 biggen afkomstig van gelten (A, B, G en H). Het gemiddelde speengewicht van de 10 biggen bedroeg 5.8 kg. Het gewicht van alle biggen (n=1067) die gespeend werden op dat moment was volgens de weging van de veehouder 5640 kg ofwel 5.3 kg per big. De veehouder merkte een lichte stijging van het speengewicht op sinds Danbred zeugen met Duitse Piétrains worden gekruist. Voorheen zat het speengewicht rond de 5.0 kg (Danbred x Belgische Piétrain).

De gemiddelde dagelijkse groei van de geselecteerde biggen was goed met een gemiddelde van 448 g/dag. Toch zijn er grote variaties waar te nemen tussen de biggen. De slechtste groei werd gezien bij biggen A (171 g/dag) en B (238 g/dag), die voortgebracht werden door een gelt. De pariteit lijkt weinig invloed te hebben, aangezien biggen G (471 g/dag) en H (564 g/dag), voortgebracht werden door een andere gelt en beduidend beter groeiden.

Tabel 7. Biggeninformatie en gewichtsevolutie bedrijf 2

Big	Zeug n°	Pariteit	Worp grootte (levend)	Geslacht	Gewicht (kg)		Dag. groei (g) (over 42 dagen)
					Begin (kg) (dag 1)	Einde (dag 43)	
A	266	1	13	V	4,9	12,1	171
B				M	5,6	15,6	238
C	072	3	20	M	6,0	29,6	562
D				M	5,8	28,1	531
E	459	9	14	M	4,9	22,0	407
F				M	5,0	26,3	507
G	252	1	18	M	6,0	25,8	471
H				V	6,7	30,4	564
I	20	5	18	M	6,2	24,2	429
J				V	7,2	27,9	493
Gemiddelde					5,83	24,20	448

5.2.2 Diarree score

Tijdens ieder bezoek werd de feces van de biggen gescoord. Milde diarree werd waargenomen bij 2 dieren op 2 tijdstippen: big A (dag 0) en big J (dag 10). Explosieve waterige of bloederige diarree werd niet vastgesteld. Wel was de mest relatief slap bij de meeste biggen op de meeste tijdstippen. De gemiddelde scores voor ieder tijdstip bevinden zich tussen de grenswaarden voor zachte (6 op schaal van 7) en pasteuze mest (5 op schaal van 7). Een mogelijke verklaring voor de slappere mest kan het gebruik van brijvoeding zijn, waarbij het droge stofgehalte in het opgenomen voeder lager ligt in vergelijking met meel of pellet.

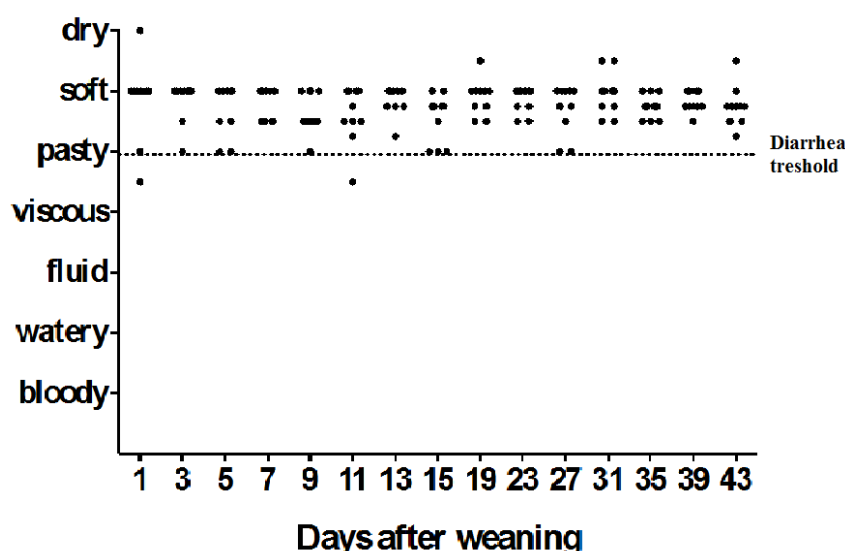


Fig.13. Toegekende mestscores gedurende opvolging in de biggenbatterij

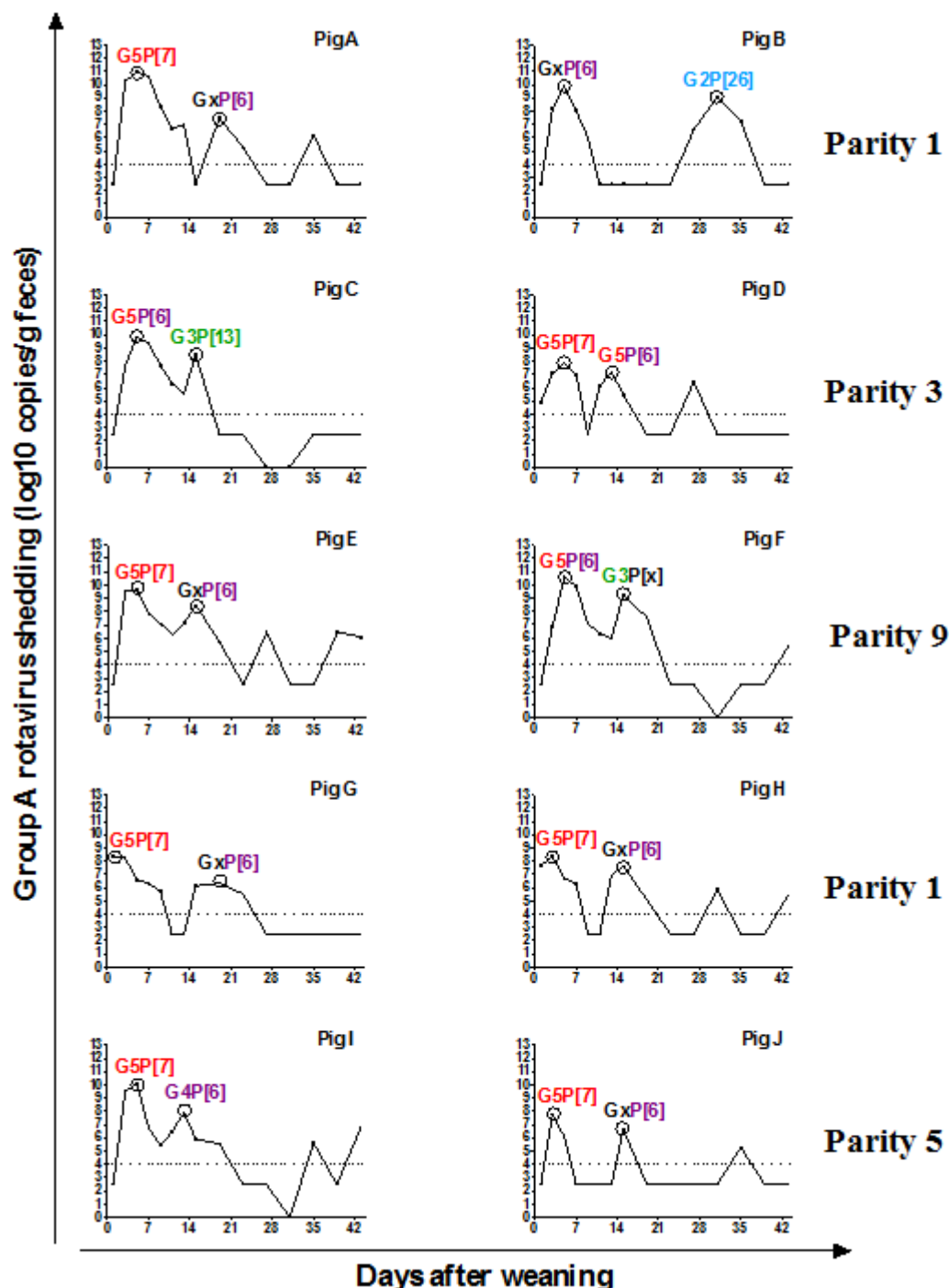
5.2.3 Fecale uitscheiding van groep A en C rotavirussen

De uitscheiding van groep A rotavirussen werd vastgesteld voor de verschillende tijdstippen en de verschillende biggen. De kinetieken van uitscheiding zijn weergegeven in grafiek 2. Stammen op het hoogtepunt van verschillende vermeederingsgolven werden genetisch gekarakteriseerd. Hierbij werden genotypes vastgesteld voor de buitenste kapsiedeiwitten van het virus: G-genotypes voor het eiwit VP7 en P-genotypes voor het eiwit VP4.

Alle biggen werden positief bevonden voor groep A rotavirussen op dag 1 na het spenen, alhoewel deze biggen weinig virus uitscheidten in hun mest. Voor de meeste biggen was de hoeveelheid uitgescheiden virus zo laag dat deze niet meer exact te bepalen was, maar voor 2 biggen (big G en H), afkomstig van een gelt, kon een relatief hogere lading gedetecteerd worden. Dit kan erop wijzen dat de lactogene immuniteit van deze gelt makkelijker te doorbreken was. Vermoedelijk liepen de biggen deze eerste infectie dus op in de kraamstal en kon de vermeederding onmiddellijk doorbreken na het spenen door het wegvallen van de lactogene immuniteit via de zeugenmelk. Het hoogtepunt van de virale uitscheiding werd gezien op dag 5 na spenen en de vermeederingsgolf duurde gemiddeld tot dag 7 of 13 na spenen. Onmiddellijk hierna trad bij de meeste biggen een tweede replicatiegolf op. Bij de tweede golf was de virusuitscheiding steeds lager (in vergelijking met de eerste golf), wat er op kan wijzen dat er reeds een geringe kruisbescherming wordt geïnduceerd tegenover opeenvolgende infecties of dat er een zekere vorm van leeftijdsresistentie bestaat. Statistische analyse toonde een significant verschil ($p < 0.05$) tussen de AUC van piek 1 en piek 2 aan. In sommige biggen werd ook een derde replicatiegolf gezien, maar deze was zeer laag en kort.

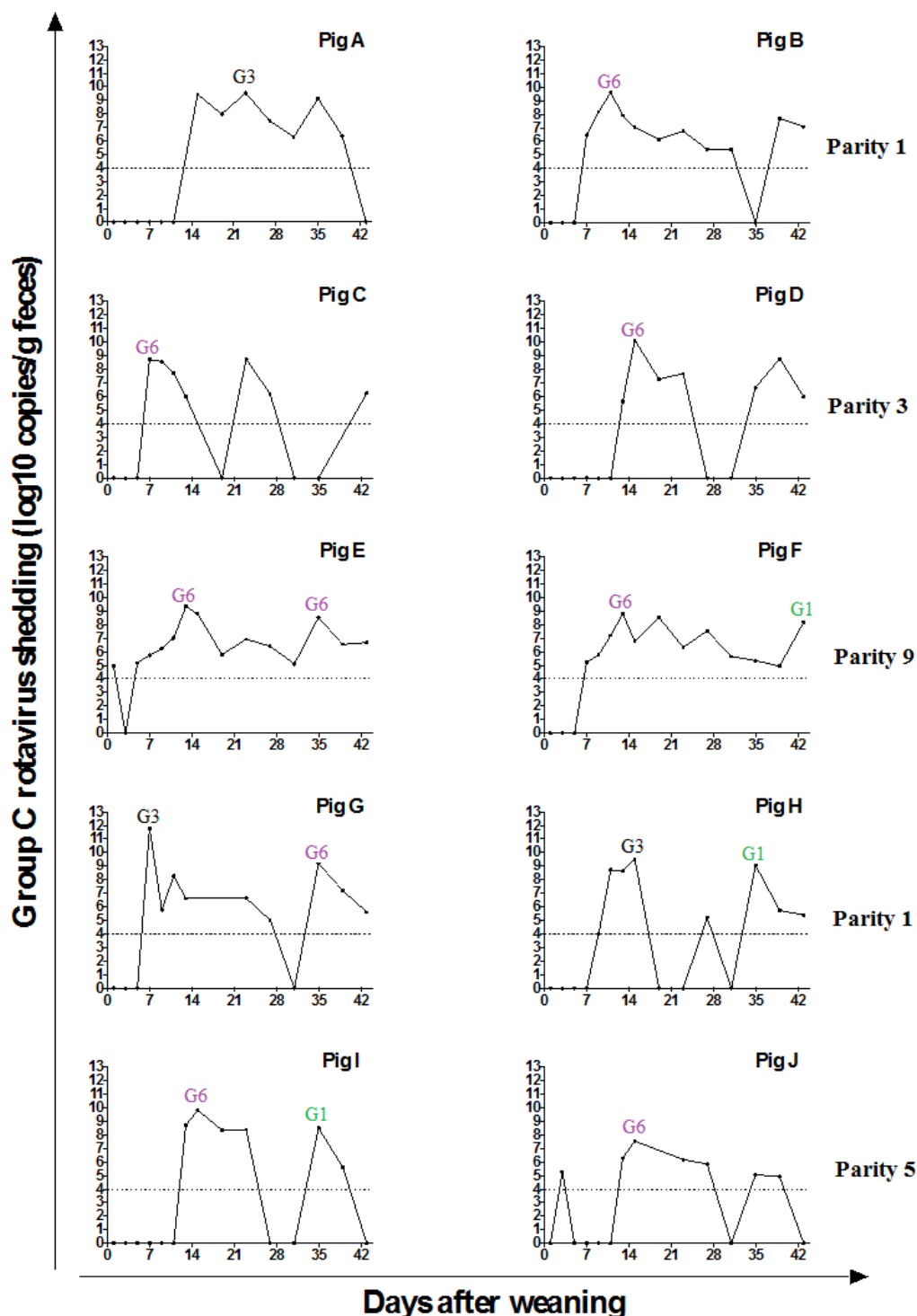
Uit de typering blijkt dat er veel genetisch verschillende stammen voorkomen op het bedrijf. De eerste golf werd voornamelijk veroorzaakt door G5P[7] of G5P[6] stammen. De G5P[7] komen in België en wereldwijd frequent voor en werden al veel teruggevonden in stalen met diarree tijdens andere studies. Tijdens de tweede golf komen er meerdere stammen

tevoorschijn: G3P[13], G4P[6] en G2P[26]. Deze aanwezigheid van variatie zou verklaard kunnen worden doordat er geen desinfectie wordt toegepast op het bedrijf. Hierdoor kunnen rotavirussen accumuleren in de omgeving en wanneer biggen door 2 verschillende stammen tegelijk geïnfecteerd worden, kunnen ze gensegmenten uitwisselen (reassortering). Op deze manier kunnen nieuwe heterogene stammen gecreëerd worden.



Grafiek 2. Uitscheiding van RVA in de mest en de gevonden genotypes op de pieken van uitscheiding

Zoals weergegeven in grafiek 3 start de uitscheiding van rotavirus C bij de meeste biggen zeven dagen later ten opzichte van rotavirus A. Dit kan erop wijzen dat de biggen deze infectie oplopen in de batterij. Bij sommige dieren (big A, B, E en F) merken we een hele hoge en lange replicatiegolf op. Er werden tot nu toe drie verschillende G-genotypes teruggevonden: G1, G3 en G6. Statistische analyse van de totale AUC waarden van RVA en RVC tonen een negatieve correlatie met zowel het eindgewicht op het einde van de batterijperiode ($p=0.013$) als met de dagelijkse gewichtstoename ($p=0.035$) aan.



Grafiek 3. Uitscheiding groep C rotavirussen in de mest

6 Discussie en algemeen besluit

Zowel het rotavirus als *Escherichia coli* worden aanzien als belangrijke oorzaken van diarree bij biggen in de kraamstal en na het spenen. Het voorkomen van deze ziekteverwekkers kan leiden tot een verminderde gewichtstoename, toename van de mortaliteit en een stijging van het antibioticaverbruik⁸⁵.

Om het voorkomen van rotavirussen op Vlaamse varkensbedrijven te verduidelijken werd hiervoor reeds onderzoek uitgevoerd door Theuns en collega's. In dat onderzoek werden er stalen verzameld van biggen met en zonder diarree, die geanalyseerd werden op aanwezigheid van rotavirus A en C met behulp van verschillende diagnostische technieken. Hieruit bleek dat de diagnose van RVA en RVC infecties gemakkelijk gemist wordt wanneer enkel snelle antigendetectietesten worden toegepast. De RT-qPCR blijkt de meest sensitieve methode om porciene RVA infecties op te sporen in meststalen⁸⁶.

Op beide varkensbedrijven die tijdens de beginfase van deze studie werden opgevolgd, kon rotavirus A aangetoond worden. Eén dag na de geboorte werden de geselecteerde biggen op het eerste bedrijf gewogen, het gemiddelde gewicht bedroeg 1.52 kilogram. Wetende dat biggen na de geboorte gemiddeld 1.2 kilogram wegen⁸⁷, is dit geen slecht resultaat. Op een leeftijd van 19 dagen, het einde van de kraamstalperiode, werden de biggen opnieuw gewogen. Het gemiddelde gewicht bedroeg op dat moment 5.76 kilogram. Dit komt overeen met een gemiddelde dagelijkse groei van 238 gram. Beide eindgetallen liggen net onder de standaardwaarden: biggen van drie weken oud wegen gemiddeld 6.3 kilogram en vertonen een dagelijkse groei van 260 gram⁸⁹. Tijdens de kraamstalperiode werd er op dag 14 en 17 diarree waargenomen bij twee biggen. Het tijdstip van voorkomen valt samen met de piekuitscheiding van rotavirus A bij deze biggen. Beide biggen kwamen uit hetzelfde nest en waren afkomstig van een tweedeworps zeug. Drie andere biggen, waarvan één afkomstig van een vijfde worps zeug en twee van een vierde worps zeug, maakten tijdens de kraamstalperiode eveneens een rotavirus infectie door. Deze biggen vertoonden echter geen diarree tijdens het verloop van de studie. Stamtypering van de positieve stalen wees het voorkomen van een G4P[6] stam aan op het bedrijf. Er wordt aangenomen dat de lactogene immuniteit van gelten minder goed ontwikkeld is, aangezien zij over het algemeen niet blootgesteld worden aan RVA infecties die regelmatig circuleren in de kraamstal⁸⁸. Deze stelling kan hier niet bevestigd worden: de enige biggen die rotavirus uitscheidten waren namelijk afkomstig van meerdereworps zeugen. Biggen worden geboren zonder maternale antistoffen. Hierdoor kunnen niveaus van circulerende maternale antistoffen in een big onder proefomstandigheden makkelijk gemanipuleerd worden door het volume of de afkomst van het colostrum de eerste 24-36 uur na de geboorte te bepalen. Een studie wijst uit dat hoe meer maternale antistoffen het big kan opnemen, hoe minder lang en ernstig rotavirus diarree zich zal voordoen. Bescherming tegenover rotavirus infecties, bij biggen ouder dan drie dagen, wordt waarschijnlijk bewerkstelligd door transsudatie van serum IgG naar de darm in de plaats van het persisteren van residuele antistoffen afkomstig van de initiële colostrumopname. Onder natuurlijke omstandigheden verkrijgen neonatale biggen bijkomstige maternale antistoffen (voornamelijk sIgA) via de zeugenmelk. Daarenboven scheidt de zeug rond de partus rotavirus uit, hetgeen zorgt voor een bron van infectieus virus. Veldstudies suggereren dat neonatale biggen geïnfecteerd geraken kort na de geboorte, maar dat het doorbreken van de infectie onder controle wordt gehouden door de aanwezigheid van voldoende hoge maternale antistoffentiters⁸⁹. De biggen op dit bedrijf, afkomstig van meerdereworps zeugen, kunnen minder colostrum of melk opgenomen hebben waardoor er toch diarree is uitgebroken. Het is eveneens mogelijk dat de melk van

⁸⁵ Theuns *et al.* (2015)

⁸⁶ Theuns *et al.* (2016)

⁸⁷ De Backer (2010)

⁸⁸ Saif & Fernandez(1996)

⁸⁹ Ward *et al.* (1996)

de zeug, waarvan de biggen diarree vertoonden, te weinig antistoffen bevatte om de infectiedruk aan te kunnen. Ook de omgevingstemperatuur kan een rol spelen in het al dan niet ontstaan van diarree. Een studie uitgevoerd door Armstrong en Cline toont aan dat na het toedienen van *E. coli*, biggen in een koude omgeving (10°C) sneller en langduriger diarree vertonen dan biggen die gehuisvest worden in een normale omgevingstemperatuur (28,3°C)⁹⁰.

Uit bacteriologisch onderzoek kon bij de biggen met diarree enkel niet-hemolytische *E. coli* vastgesteld worden. Bij één big trad er na de piekuitscheiding van RVA een verschuiving op van niet-hemolytische naar hemolytische *E. coli*. Zoals eerder aangehaald, vertoonde dit big evenwel geen diarree. De onderzochte *E. coli* kolonies testten negatief op de aanwezigheid van F4⁺ fimbriae. *E. coli* die geïsoleerd wordt bij biggen uit de kraamstal, wordt enkel getest op de aanwezigheid van F4⁺ fimbriae aangezien de expressie van F18⁺-receptoren bij niet gespeende biggen nog niet volledig voltooid is⁹¹. Er kunnen meerdere factoren aan de basis liggen van de rotavirus uitbraak bij deze biggen, zoals de omgevingstemperatuur, oriëntatie van de stal, nestgrootte... Het belang van deze elementen zal verder onderzocht worden tijdens het verdere verloop van de studie.

Op het tweede bedrijf werden de geselecteerde biggen opgevolgd tijdens de biggenbatterij. De eerste dag na het spenen, op een leeftijd van 20 dagen, wogen de biggen gemiddeld 5.83 kilogram. Ook dit gewicht ligt onder de standaardwaarde van 6.3 kilogram. Op het einde van de biggenbatterij bedroeg het gemiddelde gewicht bij deze biggen 24.20 kilogram, hetgeen overeenkomt met een gemiddelde dagelijkse groei van 448 gram. Over het algemeen kon er een grote variatie in gewicht waargenomen worden bij deze biggen. Zo wogen twee biggen (afkomstig van een gelt) respectievelijk 12.1 en 15.6 kilogram, wat ver onder het gemiddelde ligt. Eén big vertoonde op dag 1 van de studie diarree. Op dag 10 werd er diarree vastgesteld bij een ander big. Dit zijn de enigste twee tijdstippen tijdens het studieverloop waarop er platte mest werd vastgesteld. Over het algemeen vertoonden alle biggen op elk tijdstip slappere mest, maar dit zou verklaard kunnen worden door het feit dat er brijvoeding gevoederd wordt. Aan het begin en het einde van de batterijfase werd er bloed verzameld bij de geselecteerde biggen om de IgG titer te bepalen. Deze resultaten toonden echter geen correlatie aan tussen de ergheid van rotavirus vermeerdering en de IgG antistoffentiter in het bloed. Dit leert ons dat serum antistoffen geen goede weergave zijn voor de lokale, beschermende immuniteit in de darm. Alle biggen op dit bedrijf vertoonden tijdens de opvolging 2 of 3 replicatiegolven van rotavirus A. Twee van de 10 biggen werden reeds positief bevonden op dag 1 van de studie, waaruit geconcludeerd kan worden dat deze biggen de infectie reeds in de kraamstal hebben opgelopen. De eerste rotavirus A replicatiegolven werden veroorzaakt door een G5P[7] of een G5[6] stam. De replicatiepieken van de tweede golven lagen lager dan de eerste golven, hetgeen een geringe kruisbescherming doet vermoeden. Er lagen verschillende stammen aan de basis van het ontstaan van deze tweede replicatiegolven: zowel G3P[13], G4P[6] als G2P[26] stammen werden teruggevonden. Indien er een derde golf optrad bij de biggen, was deze golf lager en korter dan de voorgaande. Het feit dat er op dit bedrijf enkel gereinigd werd, kan het voorkomen van deze verschillende stammen verklaren. Het fenomeen van reassortering is redelijk ongewoon bij humane RVA stammen. De kans voor een succesvolle vorming van reassortante RVA virussen bij varkens is groter, doordat ze gedurende het productieproces intensiever en herhaaldelijk geïnfecteerd worden met verschillende RVA stammen⁹². Op Japanse varkensbedrijven werden herinfecties met genetisch heterogene RVA stammen vastgesteld. Ook het voorkomen van reassortante RVA stammen, eigen aan een bedrijf, werd waargenomen⁹³. De uitscheiding van rotavirus C op dit bedrijf werd eveneens in elk big aangetoond. Bij de meeste biggen brak deze infectie 7 dagen later door dan de rotavirus A

⁹⁰ Armstrong & Cline (1977)

⁹¹ Coddens *et al.* (2007)

⁹² Theuns (2014)

⁹³ Theuns (2015)

infectie. Biggen werden dus hoogstwaarschijnlijk geïnfecteerd met RVC tijdens hun verblijf in de biggenbatterij. Bij 4 van de 10 dieren werd er een hoge en lange replicatiegolf waargenomen. In de huidige studie kon er geen statistische correlatie aangetoond worden tussen het voorkomen van RVA infecties en de dagelijkse groei van de biggen. Wanneer RVA en RVC infecties samen werden bekeken, zag men een negatieve correlatie optreden met de groei. Bacteriologisch onderzoek toonde aan dat op de meeste tijdstippen niet-hemolytische *E. coli* aanwezig was. Rond dag 13-15 werd er hemolytische *E. coli* vastgesteld, hetgeen samenviel met een voederomschakeling. Een studie uitgevoerd door McDonald en collega's toonde aan dat bepaalde voedercomponenten in speenvoeders, die de viscositeit van het darmkanaal buitensporig verhogen, zorgen voor een stijgende fecale uitscheiding van hemolytische *E. coli*⁹⁴. Er konden geen F4⁺ of F18⁺ fimbriae teruggevonden worden. Uitgaande van de resultaten op deze twee bedrijven, kan men geen duidelijke samenhang tussen het voorkomen van hemolytische of niet-hemolytische *E. coli* en rotavirus infecties aantonen. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of er een synergisme bestaat met sommige ETEC stammen in de pathogenese van biggendiarrée.

Dit onderzoek wordt verdergezet op meerdere bedrijven om zo de situatie in Vlaanderen te verduidelijken. Ook op Europese schaal wordt er door het Laboratorium voor Virologie actie ondernomen om met EuroRota Pignet een brede visie op het rotavirus te ontwikkelen. Op de volgende varkensbedrijven zal verder onderzocht worden of verschillende RVA stammen kunnen toegeschreven worden aan verschillende pathotypes; zoals pathogene (diarrée), subklinische (groeivertraging) en apathogene (geen symptomen) types. Het verminderen van diarreeproblemen en het behalen van optimale groeiprestaties is zeer belangrijk voor varkensbedrijven. Op deze manier kunnen biggen immers sneller doorstromen naar de volgende productierondes. Het controleren van RVA infecties kan een duurzaam alternatief blijken voor een dalend verbruik van antibiotica en zinkoxide in de sector. Verder onderzoek om deze hypothesen te kunnen staven is aangewezen aangezien dit op lange termijn kan zorgen voor een gezondheidsverbetering, zowel bij het varken als bij de mens⁹⁵.

⁹⁴ McDonald (2001)

⁹⁵ Theuns (2015)

7 Bio-ethische reflectie

Het doel van dit onderzoek is het aantonen van het belang van rotavirus infecties bij jonge biggen in Vlaanderen. Diarree veroorzaakt door rotavirus infecties zorgen in de varkenssector voor economische verliezen. Daarenboven stellen varkensboeren vaak behandelingen in met antibiotica om het optreden van speendiarree te voorkomen of te verminderen. Het gebruik van antibiotica is de laatste jaren onderwerp van controversen gezien de toenemende resistentie, zowel bij het varken als bij de mens.

7.1 Ecologische pijler

De varkenssector eist ontegensprekelijk zijn tol op het milieu. Verschillende overheidsmaatregelen op gebied van onder andere ammoniakemissie, welzijnseisen, mestafzet en –verwerking zorgen voor een minder rooskleurig toekomstperspectief voor de varkensboeren. De sector is slechts in beperkte mate in staat om te voldoen aan de gestelde eisen op gebied van milieu en welzijn. De varkensindustrie werkt bovendien antibioticaresistentie in de hand door het massaal toedienen van antibiotica. Als gevolg van dit overmatig antibioticagebruik zijn veel varkens drager van resistente bacteriën.

De eisen die gesteld worden vanuit de overheid zullen de milieu impact enigszins kunnen inperken. Een oplossing bieden voor het diarreeprobleem, het doel van deze studie, zou het gebruik van antibiotica in deze sector drastisch kunnen doen dalen.

7.2 Economische pijler

Een kwart van de varkensboeren geraakt niet meer verlost uit zijn economische schulden door de aanhoudende lage prijzen voor varkensvlees en de hoge werkingskosten. Goedkoop vlees dat wordt geïmporteerd vanuit Polen, Spanje of Duitsland zorgt er eveneens voor dat Vlaamse varkensboeren amper het hoofd boven water kunnen houden. Onder meer veevoederfabrikanten en veeartsen worden hierdoor ook getroffen: boeren kunnen hun rekeningen niet meer (op tijd) betalen.

Ook hier zou het aanpakken van het diarreeprobleem voor een gedeeltelijke oplossing kunnen zorgen. Varkens zouden dan minder groeiachterstand vertonen en verkocht kunnen worden aan een hoger slachtgewicht, waardoor boeren meer geld verdienen per varken. Ook de kosten van het antibioticagebruik zouden dalen. Of dit de schuldenput ook daadwerkelijk kan opvullen is nog maar de vraag... Doordat er teveel productie is in Vlaanderen, zullen hoogstwaarschijnlijk enkel de topbedrijven kunnen overleven.

7.3 Sociale pijler

Doordat de voedingsketen van boer naar bord veel tussenschakels omvat (slachthuizen - uitsnijderijen – vleesverwerkingsbedrijven – slagers – supermarkten) houdt de boer niet veel over van zijn zuurverdiende centen. Supermarktketens toonden zich eind vorig jaar bereid om extra centen te betalen aan de boeren die vlees aanleveren. Vanuit de overheid werd beslist om 24 miljoen euro extra in de varkensindustrie te pompen. Of deze maatregelen zullen voldoen, moet nog blijken. Ook de consument moet zich bereid tonen om meer geld op tafel te leggen voor varkensvlees. Het duurzaam werken van supermarkten, slachthuizen,... kan ervoor zorgen dat de varkensboeren op het einde van de maand meer centen overhouden.

Consumenten dienen zich bewust te worden van de arbeid die varkensboeren steken in het afleveren van hun product. Dit bewustzijn zou een eerlijkere prijs voor varkensvlees kunnen betekenen. Wanneer boeren het antibioticaverbruik kunnen doen dalen, kan het consumentenvertrouwen in varkensvlees deels hersteld worden. Zo kunnen bepaalde kwaliteitslabels ontwikkeld worden zodat de veehouder zijn vlees aan een meerprijs kan verkopen. Het dierenwelzijnsaspect dat de publieke opinie voor ogen heeft, zal nog lange tijd een werkpunt voor de varkensindustrie blijven.

8 Publiceerbaar artikel

VARKENS EN DIARREE: EEN ONDERSCHAT PROBLEEM

De varkenssector vormt binnen de Belgische landbouw de belangrijkste subsector wat dierlijke productie betreft. Tussen 2006 en 2013 was deze sector verantwoordelijk voor 35,9% van de dierlijke productie. Toch heeft de varkenssector met heel wat problemen te kampen. Zo vormt diarree, veroorzaakt door het rotavirus, bij jonge biggen in de kraamstal en biggenbatterij een belangrijk gezondheidsprobleem. Het rotavirus kan leiden tot een verminderde gewichtstoename, een hoger sterftecijfer en een toename van het antibioticaverbruik. Hierdoor verliest de Vlaamse economie jaarlijks 1,8 miljoen euro. Een grootschalige studie, opgezet door het IWT en het laboratorium voor Virologie (UGent-Faculteit Diergeneeskunde), zal de klinische en economische impact van dit virus op Vlaamse varkensbedrijven in kaart brengen.

Rotavirussen veroorzaken ernstige diarree bij mensen, meerdere zoogdieren en vogels. Varkens kunnen besmet geraken met vier verschillende soorten rotavirus (rotavirus A, B, C of H). Ze nemen het virus langs hun mond op via besmette mest, waarna het zich vermenigvuldigt in de darmcellen van de dunne darm. Hierdoor ontstaat er diarree. Rotavirus A komt voornamelijk voor bij biggen tussen de 21 dagen en 60 dagen oud. Rotavirus C komt hoofdzakelijk voor bij biggen jonger dan 3 weken. Geïnfecteerde biggen kunnen het virus tot twee weken lang uitscheiden via hun mest.

Een hardnekkig virus?

Rotavirussen komen voor op elk varkensbedrijf. Er zijn steeds meerdere factoren die een rol spelen bij het ontstaan van diarree, zoals: met hoeveel virusdeeltjes is het varken besmet geraakt? Hoe oud was het big bij het ontstaan van de infectie? Hoe zit het met de weerstand van het dier op het moment van besmetting? Het virus komt niet alleen voor op elk bedrijf, het is ook nog eens zeer moeilijk weg te krijgen tijdens het reinigen en ontsmetten van de stallen doordat niet alle reinigings- en ontsmettingsmiddelen in staat zijn om het virus te vernietigen.

Krijgen biggen altijd diarree?

Niet alle biggen die besmet zijn met het rotavirus zullen diarree krijgen. Het virus wordt dus evengoed teruggevonden bij biggen zonder diarree. Bovendien is het rotavirus niet altijd verantwoordelijk voor

het verschijnen van platte mest. Ook andere virussen, bacteriën (zoals Salmonella) en parasieten kunnen de oorzaak zijn van het probleem.

Na de geboorte gaan biggen zo snel mogelijk melk drinken bij de zeug. Deze eerste melk bevat vele antistoffen die de biggen beschermen tegen allerlei ziektekiemen. Tijdens de volledige zoogperiode geeft de zeug via haar melk antistoffen door aan haar kroost. Antistoffen belanden in de melk doordat de zeug vroeger zelf besmet is geraakt met virussen of bacteriën en haar lichaam als reactie hierop deze stoffen aanmaakt. Er wordt gezegd dat gelten (vrouwelijke varkens die voor de eerste keer jongen krijgen) een minder goede bescherming doorgeven aan hun biggen, omdat ze tijdens hun leven minder vaak in contact zijn geweest met de aanwezige ziektekiemen op een bedrijf.



Werken aan een oplossing

Mest van geïnfecteerde biggen kan onderzocht worden op de aanwezigheid van het rotavirus in een diergeneeskundig laboratorium. Varkensboeren die vaststellen dat hun biggen diarree hebben,

leggen deze dieren best in een warme, droge en tochtvrije omgeving. Het is belangrijk om te voorkomen dat de biggen uitdrogen: regelmatig water geven is dus aangeraden. Het verhinderen van rotavirus infecties op een bedrijf is moeilijk. Er worden plasmapoeders op de markt aangeboden waarin antistoffen aanwezig zijn. Deze antistoffen zouden in de darm de werking van het virus kunnen beletten. De werking van plasmapoeders wordt tijdens deze studie eveneens onder de loep genomen. Vanuit Europa komt er een toenemende druk om het antibioticaverbruik in de varkenssector te verminderen. Dit kan deels bekomen worden door tijdens de eerste 2 weken nadat de biggen van de zeug zijn weggehaald, zinkoxide bij te voederen. Zinkoxide zou stabiliserend werken op het spijsverteringsstelsel van het varken, waardoor het virus minder kansen krijgt om zich vast te hechten aan de darmcellen.

Onderzoek volop aan de gang

Onderzoekers aan het Laboratorium voor Virologie op de Faculteit Diergeneeskunde in Merelbeke zijn bezig met het opvolgen van verschillende varkensbedrijven met diarreeproblemen in de kraamstal of op de biggenbatterij. Op de bedrijven die tot nog toe werden opgevolgd, werden rotavirus A infecties teruggevonden bij 15 van de 19 biggen. Verder onderzoek zal meer licht op de zaak werpen, waarbij meerdere factoren die een rol spelen bij het ontstaan van diarree ook bestudeerd zullen worden. Dit landbouwtraject heeft tot doel om de varkensboer in Vlaanderen te helpen bij het aanpakken van dit probleem, zowel op klinisch als op economisch vlak. Het controleren van rotavirus A infecties zou namelijk een duurzaam alternatief kunnen blijken voor een dalend verbruik van antibiotica en zinkoxide in de sector.

9 Voorstelling van de dagelijkse werkzaamheden

07/09/2015	- voorstelling en inleiding rotavirus en IWT project
08/09/2015	- rondleiding labo en literatuurstudie rotavirus
09/09/2015	- literatuurstudie rotavirus
10/09/2015	- uitvoeren IPMA
11/09/2015	- volgen en uitvoeren DNA extractie
14/09/2015	- biggen ophalen bij varkensboer en inzetten dierproef
15/09/2015	- faecale swabs biggen verzamelen, collecteren en DNA extractie
16/09/2015	- faecale swabs biggen verzamelen, collecteren, DNA extractie en qPCR
17/09/2015	- faecale swabs biggen verzamelen, collecteren en DNA extractie
18/09/2015	- faecale swabs biggen verzamelen, collecteren en DNA extractie
21/09/2015	- qPCR uitvoeren
22/09/2015	- faecale swabs, pharyngeale swabs en nasale swabs verzamelen bij biggen - qPCR uitvoeren, cryocouples snijden
23/09/2015	- literatuurstudie rotavirus
24/09/2015	- faecale swabs, pharyngeale swabs en nasale swabs verzamelen bij biggen - volgen SN-test en terugtitratie
25/09/2015	- volgen titratie - uitvoeren IPMA
28/09/2015	- literatuurstudie rotavirus - bespreking bedrijfsbezoeken
29/09/2015	- opzoekwerk virologie
30/09/2015	- opzoekwerk virologie
01/10/2015	- qPCR rotavirus uitvoeren - PCR bocavirus
02/10/2015	- bedrijfsbezoeken: anamneses afnemen op 2 bedrijven
05/10/2015	- voorbereiding + informatie verzamelen bedrijfsbezoek
06/10/2015	- opzoekwerk celbiologische technieken
07/10/2015	- opzoekwerk celbiologische technieken
08/10/2015	- qPCR rotavirus volgen
09/10/2015	- bedrijfsbezoek bedrijf 1: selectie biggen - inoculatie celcultuur (MA104 cellen)
12/10/2015	- literatuurstudie rotavirus
13/10/2015	- staalname varkensbedrijf 1 - verwerken bloedstalen
14/10/2015	- titratie volgen
15/10/2015	- staalname varkensbedrijf 1 - verwerken fecale swabs
16/10/2015	- uitvoeren qPCR rotavirus + FIP
19/10/2015	- staalname varkensbedrijf 1 - verwerken fecale swabs
20/10/2015	- literatuurstudie rotavirus
21/10/2015	- staalname varkensbedrijf 1 - verwerken fecale swabs
22/10/2015	- bedrijfsbezoek - extractie RNA
23/10/2015	- staalname varkensbedrijf 1 - verwerken fecale swabs - extractie RNA

26/10/2015	- voorbereiding dierproef, biggen wegen en voederen
27/10/2015	- staalname varkensbedrijf 1
28/10/2015	- verzamelen fecale swabs dierproef, voederen biggen - extractie RNA - bespreking eerste resultaten varkensbedrijf 1
29/10/2015	- verzamelen fecale swabs dierproef, voederen biggen - bloed trekken bij biggen, wegen
30/10/2015	- literatuurstudie rotavirus - voederen biggen
03/11/2015	- verzamelen fecale swabs dierproef, voederen biggen - literatuurstudie rotavirus
04/11/2015	- staalname varkensbedrijf 1 - verwerken fecale swabs - extractie RNA
05/11/2015	- verzamelen bloed, fecale swabs, wegen en voederen biggen - autopsie gestorven big en verzamelen weefsels
06/11/2015	- uitvoeren IPMA
09/11/2015	- autopsie gestorven big en verzamelen weefsels - aflezen bacteriologische platen - voederen biggen

10 Werkzaamheden niet in functie van je eindwerk

Tijdens mijn stage werd ik eveneens betrokken bij dierproeven die op het laboratorium voor Virologie plaatsvinden. Ik hielp bij het klinisch observeren van de varkens (algemene toestand, activiteit, etenslust,...), hun dagelijkse verzorging en het controleren van de lichaamstemperatuur. Er werd mij aangeleerd om bloed te trekken bij zuigende en gespeende biggen en bij mestvarkens (tot 70 kilogram), alsook om nasale swabs te collecteren.

Het controleren van de lichaamstemperatuur bij neonatale biggen gebeurt door deze biggen ondersteboven vast te houden aan één achterpoot en de thermometer in het rectum te brengen. Oudere biggen worden tezamen in een hoek gedreven terwijl je de staart aanraakt van het big waarbij je de temperatuur wil opnemen. Bij mestvarkens breng je de thermometer in en blijf je het varken volgen, hierbij mag er niet aan de staart getrokken worden⁹⁶.

Bloedname bij gespeende biggen gebeurt via de vena jugularis of de vena cava cranialis. Er kunnen twee verschillende methoden worden toegepast. Het big kan ondersteboven vastgenomen worden door één persoon die alle vier de poten vasthoudt. De persoon die bloed trekt, houdt met één hand het hoofd vast en palpeert met zijn andere hand het manubrium sterni. Vanuit dit punt kan de naald ongeveer 1 centimeter richting het hoofd van het big worden ingebracht. Prikken aan de rechterzijde van het dier wordt aangeraden, aangezien op deze manier de nervus vagus wordt vermeden. Gespeende biggen kunnen ook met hun achterbenen tussen de knieën van een persoon worden vastgehouden. Hierbij houdt de helper met één hand de snuit van het big vast en met het ander hand één voorpoot. De persoon die bloed trekt, houdt de andere voorpoot vast en palpeert naar het manubrium sterni. Naast het manubrium sterni bevindt zich een kleine holte, waar de naald voor 2-2,5 cm in mediale richting kan ingebracht worden.

Mestvarkens worden voor bloedname in bedwang gehouden met een strop. Ook bij mestvarkens neemt men bij voorkeur aan de rechterkant van het varken bloed. Na palpatie van het manubrium sterni wordt de naald ingebracht richting de bovenkant van de andere schouder (45° in elke richting)⁹⁰.

Voor het nemen van nasale swabs worden de varkens op dezelfde manier in bedwang gehouden als voor het nemen van een bloedstaal. Een katoenen swab wordt hierbij in het neusgat ingebracht, over een lengte van 5 centimeter (jonge biggen) tot 10 centimeter (mestvarkens) en voorzichtig rondgedraaid⁹⁰.

⁹⁶ Bonckaert (2015)

11 Persoonlijke visie

11.1 Persoonlijke visie op het stagebedrijf

Het Laboratorium voor Virologie is een dynamische werkplaats voor mensen die geïnteresseerd zijn in het virologisch onderzoek bij dieren. De vele doctoraatsstudenten werken elk zelfstandig op hun eigen onderzoeksonderwerp en worden voor de uitvoering bijgestaan door de laboranten. De doctoraatsstudenten kunnen steeds bij elkaar en bij Prof. Dr. Hans Nauwynck ten rade gaan wanneer er problemen optreden. Dit zorgt voor een aangename en jonge werksfeer, hetgeen een sterk punt van dit stagebedrijf vormt. Doordat mensen na 4 jaar hun doctoraat afleggen en er steeds nieuwe doctoraatsstudenten bijkomen, wordt er een levendige werkomgeving gecreëerd. Dit voordeel vormt langs de andere kant een nadeel: nieuwe doctoraatsstudenten kunnen niet altijd terugvallen op de laboratoriumexpertise van de mensen die hun doctoraat reeds hebben afgelegd.

Het wetenschappelijk onderzoek leert je op een kritische en zelfstandige manier werken en resultaten interpreteren. Het is hierbij belangrijk om te aanvaarden dat niet alle bekomen onderzoeksresultaten 'rechtdoorzee' zijn. Het uitkomen van bepaalde (onverwachte) resultaten maakt het soms moeilijk om correcte of concrete conclusies te trekken. Het kritisch denken en correct interpreteren van resultaten wordt op een aangename manier gestimuleerd in het laboratorium. Bovendien word je vrijgelaten in het zoeken of optimaliseren van onderzoekstechnieken, steeds met voldoende begeleiding, waardoor je jezelf kan ontplooiën. Deze punten maken van deze stageplaats een zeer mooie aanvulling op mijn opleiding.

11.2 Persoonlijke visie op je stage en je functioneren

Ik heb mijn stage als zeer aangenaam en leerrijk ervaren. Tijdens mijn stage heb ik veel zaken bijgeleerd, zowel in het omgaan met varkens als in het werken in een laboratorium. In het begin schrok het werk in het labo mij enigszins af gezien mijn zeer beperkte ervaring. Het spreekwoord 'al doende leert men' is hier zeker op zijn plaats. Dankzij de goede begeleiding en het feit dat je niet scheef wordt bekeken als er iets mislukt in het labo, voel ik mij hier steeds meer thuis. Tussen de varkens voelde ik mij veel sneller op mijn gemak aangezien ik altijd al graag met dieren ben bezig geweest.

Als afgestudeerde dierenverzorger kan je in het laboratorium zeker een meerwaarde bieden. Niet enkel voor de dagelijkse verzorging van de aanwezige proefdieren, maar ook voor de organisatie en het draaiende houden van het labo. Bovendien kan je als dierenverzorger helpen bij de dierproeven die worden uitgevoerd, zoals het klinisch observeren van de dieren en het nemen van stalen (bijvoorbeeld collecteren van bloed). Een gemotiveerde en leergierige dierenverzorger kan hier zelfs de kans krijgen om te doctoreren en zo een eigen onderzoek uitwerken. Deze stageplaats is dus zeker aan te raden aan medestudenten met interesse in het onderzoek!

Bijlagen

Bijlage 1: anamneseformulier

WP-1 Anamneseformulier longitudinale veldstudie rotavirussen in Vlaanderen

Datum afname anamnese: door:

1. Bedrijf in te vullen door dierenarts

Naam

Adres

Telefoon

E-mail

2. Dierenarts in te vullen door dierenarts

Naam

Adres

Telefoon

E-mail

3. Kengetallen bedrijf

Aantal zeugen

Gebruikte wekensysteem weken

Gelten ☐ eigen productie ☐ aankoop

Vervangingspercentage zeugen

Aantal worpen/zeug/jaar

Totaal aantal geboren biggen per worp

Aantal levend geboren biggen per worp

Aantal doodgeboren/zwakke biggen per worp

Gemiddeld geboortegewicht (kg)

Sterfte % in de kraamstal

Aantal gespeende biggen/zeug/jaar

Speenleeftijd

Speengewicht (kg)

Dagelijkse groei batterijfase (g/dag)

Aantal biggen/batterij unit

Sterfte % in de batterij

Leeftijd verkochte biggen

Gemiddeld gewicht verkochte biggen

Ras zeug

Ras beer ☐ KI ☐ Eigen

4. Reiniging & desinfectie

Verwijderen organisch materiaal ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Legen van voederbakken ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Legen mestput ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Inweken met water ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Gebruik van een reinigingsmiddel ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Product: Concentratie Weektijd:

Reinigen onder hoge druk ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Spoelen met water ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Laten drogen ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Ontsmetting met een desinfectans ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Product: Concentratie Weektijd:

Laten opdrogen ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Foggen van de stal en ventileren ☐ elke ronde ☐ af en toe ☐ nooit ☐ ander:

Duur van de leegstand tussen 2 productierondes Is de stal volledig droog bij opstarten volgende ronde ☐ ja ☐ nee ☐ geen ideeOoit advies gekregen voor reiniging en desinfectie ☐ ja ☐ nee ☐ specificeer:

Werde er ooit een Rodac-analyse uitgevoerd

om de efficiëntie van reiniging en desinfectie te evalueren?

☐ ik ken Rodac analyse niet☐ nee☐ ja resultaat

5. Voeder en supplementen

Worden biggen frequent verlegd in de kraamstal											
Wordt er een melkbar/milkiwaan gebruikt in de kraamstal?											
Gebruik creap feed?	☐ nee	☐ ja	☐ commercieel:							eigen productie	
Dagelijkse voederopname van de biggen in de batterij over de ganse periode?											
Plasma in speenvoeder	☐ nee	☐ ja	dosis			duur			product		
Zinkoxide na spenen	☐ nee	☐ ja	dosis			duur			product		
Colistine na spenen	☐ nee	☐ ja	dosis			duur			product		
pH putwater		worden er organische zuren gebruikt om te corrigeren?							☐ nee	☐ ja	
		in alle stallen?							☐ ja	☐ nee	specifieer

Schematisch overzicht van voeders en supplementen die biggen toegediend krijgen

[illegible]

Voeg in bijlage een etiket van de voedersamenstelling toe

6. Gezondheidsproblemen in de kraamstal & batterij

Kraamstalfase

Frequentie diarreeproblemen ☐ iedere ronde ☐ af en toe een ronde ☐ bijna nooit ☐ nooit ☐ geen idee

Type diarree ☐ waterig ☐ pasteus ☐ vetig ☐ bloederig ☐ andere:

Problemen het meest bij biggen van ☐ gelten ☐ meerworps zeugen ☐ beiden ☐ geen idee

Werd er in de laatste 6 maanden een mestonderzoek uitgevoerd om de oorzaak van diarree bij zuigende biggen te achterhalen? ☐ nee ☐ ja, specificeer hierna labo:
referentienummer:

rotavirus A	☐ pos	☐ neg	☐ niet getest
rotavirus C	☐ pos	☐ neg	☐ niet getest
PEDV	☐ pos	☐ neg	☐ niet getest

<i>E. coli</i>	☐ niet-hemolytisch	☐ hemolytisch	☐ neg	☐ niet getest
	☐ F4+	☐ F5+	☐ F6+	☐ F41+
	☐ STa+	☐ STb+	☐ LT	
	☐ geen virulentiefactoren gedetecteerd		☐ geen virulentiefactoren getest	
<i>Cl. Perfringens</i>	☐ pos	☐ neg	☐ niet getest	
	☐ a toxine	☐ b toxine	☐ neg	☐ niet getest
<i>Isospora suis</i>	☐ pos	☐ neg		

Vaccinatie van de gelten/zeugen

Rotavirus

☐ Er wordt niet gevaccineerd tegenover het rotavirus

☐ Er wordt gevaccineerd met een bovien rotavirus vaccin, specificeer welke:

☐ Ik zou willen vaccineren tegenover rotavirussen, maar er is geen vaccins voor varkens op de markt

Coli en clostridium

☐ Er wordt niet gevaccineerd tegenover coli/clostridium

☐ Er wordt enkel gevaccineerd tegenover coli, met: ☐ Porcilis Porcoli DF ☐ Neocolipor

☐ Er wordt gevaccineerd tegen coli & clostridium, met: ☐ Porcilis Coliclos ☐ Suiseng

Andere vaccinatiestrategieën om enterische problemen te controleren:

☐ Niet van toepassing

☐ Vaccinatie van gelten/zeugen met mest van biggen met diarree

☐ Geïnactiveerde autovaccins tegenover:

Wordt er antibiotica aangewend bij diarree in de kraamstal? ☐ nee ☐ ja product:

Zijn er andere belangrijke gezondheidsproblemen die optreden in de kraamstal en worden hiertegen specifieke preventieve en/of therapeutische acties ondernomen?

Batterijfase

Frequentie diarreeproblemen

☐ iedere ronde ☐ af en toe een ronde ☐ bijna nooit ☐ nooit ☐ geen idee

Type diarree ☐ waterig ☐ pasteus ☐ vettig ☐ bloederig ☐ andere:

Werd er in de laatste 6 maanden een mestonderzoek uitgevoerd om de oorzaak van diarree bij zuigende biggen te achterhalen?

☐ nee ☐ ja, specificeer hierna labo:

referentienummer:

rotavirus A ☐ pos ☐ neg ☐ niet getest

rotavirus C ☐ pos ☐ neg ☐ niet getest

PEDV	☐	pos	☐	neg	☐	niet getest
<i>E. coli</i>	☐	niet-hemolytisch	☐	hemolytisch	☐	neg ☐ niet getest
	☐	F4+	☐	F18+	☐	STa+ ☐ STb+ ☐ LT ☐ VT2e
	☐	geen virulentiefactoren gedetecteerd		☐	geen virulentiefactoren getest	
<i>Brachyspira</i>	☐	pos	☐	neg	☐	niet getest
	☐	<i>B. hyodysenteriae</i>		☐	<i>B. pilosicoli</i>	
	☐	<i>B. Intermedia</i>		☐	<i>B. Species</i> ☐ niet getypeerd	
<i>Salmonella</i>	☐	pos	☐	neg	☐	niet getest
	☐	getypeerd:			☐	niet getypeerd

Prophylaxie van speendiarree

Plasma in speenvoeder	☐	nee	☐	ja	dosis		duur		product	
Zinkoxide na spenen	☐	nee	☐	ja	dosis		duur		product	
Colistine na spenen	☐	nee	☐	ja	dosis		duur		product	
Coliprotec F4	☐	nee	☐	ja	product niet bekend					
Probiotica	☐	nee	☐	ja	dosis		duur		product	
Organische zuren	☐	nee	☐	ja	dosis		duur		product	

Wordt er antibiotica aangewend bij diarree in de kraamstal? ☐ nee ☐ ja product:

Zijn er andere belangrijke gezondheidsproblemen die optreden in de kraamstal en worden hiertegen specifieke preventieve en/of therapeutische acties ondernomen?

7. Plattegrond van het bedrijf

Maak een schets van het bedrijf (waar situeert zich kraamstal, biggenbatterij...)

Bijlage 2: checklist opvolging kraamstal (21 dagen)

Bedrijf		Info zeug					Info big, n°					Info big, n°				
Naam:		pariteit	aantal biggen geworpen	aantal levendgeboren biggen	aantal doodgeboren biggen	oornummer	geslacht	dagelijkse groei	kraamstal	batterij	geslacht	dagelijkse groei	kraamstal	batterij		
Adres:																
Telefoon:																
E-mail																

Kraamstalfase														
DATUM	0	1	3	5	7	9	11	14	17	20				
DAG														
PERSON														
NEST														
# biggen														
# diarree														
melkgifte zeug?														
zeug gezond?														
geneesmiddelen?														
opmerkingen														
BIG:														
gewicht														
klinisch OZ														
fecale score														
swab 1														
swab 2														
geneesmiddelen?														
opmerkingen														
BIG:														
gewicht														
klinisch OZ														
fecale score														
swab 1														
swab 2														
geneesmiddelen?														
opmerkingen														

Bijlage 3: checklist opvolging biggenbatterij (42 dagen)

Naam:					partiteit				geslacht dagelijkse groei				geslacht dagelijkse groei			
Adres:					aantal biggen geworpen				kraanstal				kraanstal			
Telefoon:					aantal levendgeboren biggen				batterij				batterij			
E-mail:					aantal doodgeboren biggen				oornummer							
Batterijfase																
DAG	0	2	4	6	8	10	12	14	18	22	26	30	34	38	42	
PERSOON																
BIG:																
gewicht																
klinisch OZ																
fecale score																
swab 1																
swab 2																
bloedname																
geneesmiddelen?																
opmerkingen																
BIG:																
gewicht																
klinisch OZ																
fecale score																
swab 1																
swab 2																
bloedname																
geneesmiddelen?																
opmerkingen																

Lijst met gebruikte afkortingen

IWT-LA	: Agentschap voor Innovatie door Wetenschap en Technologie – Landbouw.....	3
VP(x)	: Viraal proteïne (x).....	9
dsRNA	: Dubbelstrengig ribonucleïnezuur.....	9
NSP	: Niet-structurele proteïnen.....	9
Nm	: Nanometer.....	9
(3)LP	: (Drie)lagig partikel.....	9
ssRNA	: Enkelstrengig ribonucleïnezuur.....	10
dsDNA	: Dubbelstrengig desoxyribonucleïnezuur.....	10
ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses.....	12
RVA	: Rotavirus A.....	12
ER	: Endoplasmatisch reticulum.....	14
TEM	: Transmissie elektronenmicroscopie.....	15
ETEC	: Enterotoxigene <i>Escherichia coli</i>	18
Ca ²⁺	: Calcium.....	18
EZS	: Enterisch zenuwstelsel.....	19
Cl ⁻	: Chloor.....	19
PEDV	: Porcine endemische diarree virus.....	20
TGEV	: Transmissibel gastroenteritis virus.....	20
slgA	: Secretorisch Immunoglobuline A.....	21
CD8 ⁺	: Cytotoxische T-cel.....	22
MHC	: Major Histocompatibility Complex.....	22
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	22
PCR	: Polymerase Chain Reaction.....	23
RT-qPCR	: Real-time kwantitatieve Polymerase Chain Reaction.....	23
SDPP	: Spray-dried Porcine Plasma.....	24
ZnO	: Zinkoxide.....	24
ppm	: Parts per million.....	24
IGF1	: Insuline Growth Factor 1.....	25
PRRSv	: Porcine Reproductief en Respiratoir Syndroom virus.....	26
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>	27
MEM	: Minimum Essential Media.....	30
IDT	: Integrated DNA Technologies.....	30
Cq	: Thresholdcyclus.....	30
AUC	: Area Under the Curve.....	31
IPMA	: Immunoperoxidase Monolayer Assay.....	32
TCID ₅₀	: Tissue Culture Infective Dose.....	32
PBS	: Phosphate-buffered Saline.....	32
AEC	: 3-amino-9ethylcarbazole.....	32
H ₂ O ₂	: Waterstofperoxide.....	32
μL	: Microliter.....	32

Lijst met figuren

Fig.1	: Structuur van een rotavirus partikel.....	10
Fig.2	: Organisatie van het rotavirus genoom.....	11
Fig.3	: Fylogenetische verwantschap tussen verschillende rotavirus species.....	13
Fig.4	: Replicatiecyclus rotavirus.....	14
Fig.5	: Voorstelling van rotavirus geïnduceerde diarree.....	19
Fig.6	: Overzicht bedrijfskengetallen bedrijf 1.....	24
Fig.7	: Overzicht bedrijfskengetallen bedrijf 2.....	25
Fig.8	: Locatie geselecteerde biggen in de kraamstal.....	27
Fig.9	: Fecaal scoresysteem biggenbatterij.....	28
Fig.10	: Locatie van de biggen in de batterij units.....	28
Fig.11	: 1,5% agarosegel.....	30
Fig.12	: Toegekende mestscores gedurende studieopvolging in de kraamstal.....	33
Fig.13	: Toegekende mestscores gedurende opvolging in de biggenbatterij.....	37

Lijst met tabellen

Tabel 1	: Taxonomie rotavirus.....	12
Tabel 2	: Genetische verwantschap tussen RVA stammen.....	17
Tabel 3	: Voederstrategie biggen kraamstal.....	25
Tabel 4	: Voederstrategie na spenen.....	26
Tabel 5	: Informatie geselecteerde biggen bedrijf 1.....	32
Tabel 6	: Bacteriologie geselecteerde biggen in de kraamstal.....	36
Tabel 7	: Biggeninformatie en gewichtsevolutie bedrijf 2.....	36
Tabel 8	: Anti-rotavirus antistoftiters (IgG) in het bloed bij biggen uit de biggenbatterij	40
Tabel 9	: Bacteriologie geselecteerde biggen in de biggenbatterij.....	40

Lijst met grafieken

Grafiek 1a	: Uitscheiding RVA in de mest (1 ^e compartiment).....	34
Grafiek 1b	: Uitscheiding RVA in de mest (2 ^e compartiment).....	35
Grafiek 2	: Uitscheiding RVA in de mest en gevonden genotypes.....	38
Grafiek 3	: Uitscheiding groep C rotavirussen in de mest.....	39

Bronvermelding

Andere bronvermeldingen

THEUNS, S., Mondelinge communicatie omtrent werkingsprincipe IPMA, 2015.

Artikels:

ARMSTRONG, W.D. & CLINE, T.R., Effects of various nutrient levels and environmental temperatures on the incidence of colibacillary diarrhea in pigs: intestinal fistulation and titration studies, Journal of Animal Science, 1977, 45, p.1042-1050.

CHANDLER-BOSTOCK, R., MELLITS, K.H., Efficacy of disinfectants against porcine rotavirus in the presence and absence of organic matter, Letters in Applied Microbiology, 2015, 61, p. 538-543.

CODDENS, A., et al., The age-dependant expression of the F18⁺ E. coli receptor on porcine gut epithelial cells is positively correlated with the presence of histo-blood group antigens, Veterinary Microbiology, 2007, 122, p. 332-341.

DESSELBERGER, U., Rotaviruses, Virus Research, 2014, 190, p. 75-96.

ESTES, M.K., et al., Rotavirus stability and inactivation, Journal of General Virology, 1979, 43, p. 403-409.

ESTES, M.K., COHEN, J., Rotavirus gene structure and function, Microbiological Reviews, 1989, 53, p. 410-449.

ESTROZI, L.F., et al., Location of the dsRNA-dependent polymerase, VP1, in rotavirus particles, Journal of Molecular Biology, 2013, 425, p. 124-132.

FAIRBROTHER, J.M., NADEAU, E. en GYLES C.L., Escherichia Coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis and prevention strategies, Animal Health Research Reviews, 2005, 6, p. 17-39.

FRYDENDAHL, K., Prevalence of serogroups and virulence genes in Escherichia coli associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches, Veterinary Microbiology, 2002, 85, p.169-182.

HOSHINO, Y., KAPIKIAN, A.Z., Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity and vaccine development, Journal of Health, Population and Nutrition, 2000, 18, p.5-14.

LECCE, J.G., et al., Rotavirus and hemolytic enteropathogenic Escherichia coli in weanling diarrhea of pigs, Journal of Clinical Microbiology, 1982, 16, p. 715-723.

LI, Z., et al., Rotavirus architecture at subnanometer resolution, Journal of Virology, 2009, 83, p. 1754-1766.

MARTELLA, V., et al., Zoonotic aspects of rotaviruses, Veterinary Microbiology, 2010, 140, p. 246-255.

MARTHALER, D., et al., Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B and C by RT-qPCR in diagnostic samples, Journal of Virological Methods, 2014, 209, p. 30-34.

MARTHALER, D., et al., Widespread rotavirus H in domesticated pigs, United States, Emerging Infectious Diseases, 2014, 20, p. 1195-1198.

MATTHIJNSSENS, J., et al., Create 3 new rotavirus species (rotavirus F, rotavirus G and rotavirus H) in the existing genus Rotavirus, ICTV, 2014, p.1-22.

MATTHIJNSSENS, J., et al., Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between Human Wa-like and Porcine rotavirus strains and Human DS-1-like and Bovine rotavirus strains, Journal of Virology, 2008, 82, p. 3204-3219.

MATTHIJNSSENS, J., et al., VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation, Archives of Virology, 2012, 157, p. 1177-1182.

MCDONALD, E.W., et al., Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic Escherichia coli in newly-weaned pigs, British Journal of Nutrition, 2001, 86, p. 487-498.

MCDONALD, S.M., PATTON, J.T., Rotavirus VP2 core shell regions critical for viral polymerase activation, Journal of Virology, 2011, 85, p. 3095-3105.

MIHALOV-KOVACS, E., et al., Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary, Emerging Infectious Diseases, 2015, 21, p. 660-663.

NESS, R.K., et al., The diagnosis of rotaviral infection, Farm Research, 1981, 38, p. 16-17.

PAPP, H., et al., Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle, Veterinary Microbiology, 2013, 165, p. 190-199.

PERIZ, J., et al., Rotavirus mRNAs are released by transcript-specific channels in the double-layered viral capsid, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110, p.12042-12047.

PESAVENTO, J.B., et al., Rotavirus proteins: structure and assembly, Current topics in microbiology and immunology, 2006, 309, p. 189-219.

RAMIG, R.F., Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection, Journal of Virology, 2004, 78, p. 10213-10220.

PIERCE, J.L., et al., Effects of spray-dried animal plasma and immunoglobulins on performance of early weaned pigs, American Society of Animal Science, 2005, 83, p. 2876-2885.

RUIZ, M.C., et al., Molecular biology of rotavirus entry and replication, The Scientific World Journal, 2009, 9, p.1476-1497.

SAIF, L.J., FERNANDEZ, F.M., Group A rotavirus veterinary vaccines, Journal of Infectious Diseases, 1996, 174, suppl.1 p. 98-106.

THEUNS, S., et al., Complete genome characterization of recent and ancient Belgian pig group A rotaviruses and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses, Journal of Virology, 2014, 89, p.1043-1057.

THEUNS, S., et al., Presence and characterisation of pig group A and C rotaviruses in feces of Belgian diarrheic suckling piglets, Virus Research, 2016, 213, p. 172-183.

TRASK, S.D., et al., Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication, Nature Reviews Microbiology, 2012, 10, p. 165-177.

VAN DIJK, A.J., et al., Growth performance of weanling pigs fed spray-dried animal plasma: a review, Livestock Production Science, 2001, 68, p. 263-274.

VENKATARAM PRASAD, B.V., et al., Three-dimensional structure of Rotavirus, Journal of Molecular Biology, 1988, 199, p. 269-275.

WARD, L.A., et al., Role of maternally derived circulating antibodies in protection of neonatal swine against porcine group A rotavirus, Journal of Infectious Diseases, 1996, 174, p. 276-282.

ZENG, C.Q.-J., et al., The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3, Journal of Virology, 1998, 72, p. 201-208.

ZHU, J., et al., Development of porcine rotavirus VP6 protein based ELISA for differentiation of this virus and other viruses, Virology Journal, 2013, 10, p. 1-8.

Boeken:

DE BACKER, P. (2010). Zakboek Varkens (1^e uitgave). Brussel: SCS Boehringer Ingelheim Vetmedica b.v.

CHEVILLE, N.F. (2009), Ultrastructural Pathology: The Comparative Cellular Basis of Disease (2nd edition). New Jersey, USA: Wiley-Blackwell.

KAHN, C.M., LINE S. (2010), The Merck veterinary manual (10th edition), Whitehouse station, N.J., USA: Elsevier Health Sciences.

STRAW, B.E., ZIMMERMAN, J.J., D'ALLAIRE, S., TAYLOR, D.J. (2006), Diseases of Swine (9th edition). Iowa, USA: Blackwell Publishing.

Niet-gepubliceerde bronnen:

AMCRA vzw (2012). Het gebruik van zinkoxide (ZnO) bij gespeende biggen in België ter preventie van speendiarree [informatiebrochure]. Gent: Faculteit Diergeneeskunde.

ANDRIES, K. (1998). Algemene Microbiologie – partim Immunologie [cursus]. Antwerpen: Universiteit Antwerpen.

ANDRIES, K. (1997). Algemene Microbiologie – partim Virologie [cursus]. Antwerpen: Universiteit Antwerpen.

BONCKAERT, C., (2015). Dierenwelzijnsel - Sampling pigs [informatiebundel]. Gent: Faculteit Diergeneeskunde - Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie.

DE SMET, S., RELAES, K., VAN GANSBEKE, S., VAN DEN BOGAERT, T., VETTENBURG, N., ESKENS, J. (2014). Kennis van varkensvoeding als sleutel tot rendabel voederen [informatiebrochure]. Brussel: Departement Landbouw en Visserij.

FU, Z.H. (1988). Epidemiology of porcine rotaviral infections [doctoraatsthesis]. Palmerston North (Nieuw-Zeeland): Diergeneeskunde.

LIFE TECHNOLOGIES (2014). *Real-time PCR handbook* [handboek]. Merelbeke: Thermo Fisher Scientific Inc.

MATTHIJNSSENS, J., THEUNS, S. (2015). *Minutes of the 7th Rotavirus Classification Working Group (RCWG) Meeting* [verslag vergadering]. Goa, India – 12th International Double Stranded RNA Virus Symposium.

NAUWYNCK, H. (2012). *Virale ziekten, prionziekten en zoönosen* [cursus]. Gent: Faculteit Diergeneeskunde – Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie.

THEUNS, S. (2014). *Aanvraagtemplate LANDBOUW-trajecten* [aanvraagtemplate]. Gent: Faculteit Diergeneeskunde – Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie.

THEUNS, S. (2015). *Porcine rotavirus infections in Belgian piglets and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses* [doctoraatsthesis]. Gent: Faculteit Diergeneeskunde – Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie.

THEUNS, S. (2015). *Protocol werkpakket 1: IPMA anti-rotavirus IgA en IgG* [laboprotocol]. Gent: Faculteit Diergeneeskunde – Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie.

THEUNS, S. (2015). *Protocol werkpakket 1: Longitudinale veldstudie om het belang van rotavirus infecties bij jonge biggen in Vlaanderen te situeren* [brochure]. Gent: Faculteit Diergeneeskunde – Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie.

THEUNS, S. (2015). *Protocol werkpakket 1: RT-qPCR analyse RVA en RVC* [laboprotocol]. Gent: Faculteit Diergeneeskunde – Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie.

VANHEE, M. (2014). *Diagnostische labotechnieken* [cursus]. Roeselare: Vives Hogeschool.

Internet:

Bauwens Jan (2015), *Dierenkliniek en laboratoria*. Geraadpleegd op 23/09/2015 op <http://www.ugent.be/di/nl/dierenkliniek-labos>.

Bauwens Jan (2015), *Faculteitsraad*. Geraadpleegd op 23/09/2015 op <http://www.ugent.be/di/nl/faculteit/raden/faculteitsraad>.

Bauwens Jan (2011), *Historiek*. Geraadpleegd op 23/09/2015 op <http://www.ugent.be/di/nl/faculteit/historiek/overzicht.htm>.

Bauwens Jan (2014), *Vakgroepen*. Geraadpleegd op 23/09/2015 op <http://www.ugent.be/di/nl/onderzoek/vakgroepen>.

Directie bestuurszaken (2015), *Over de Universiteit Gent*. Geraadpleegd op 23/09/2015 op <http://www.ugent.be/nl/univgent>.

Directie bestuurszaken (2015), *Campussen*. Geraadpleegd op 23/09/2015 op <http://www.ugent.be/nl/univgent/campussen>.

Swannet Werner (2015), *Opleidingen*. Geraadpleegd op 23/09/2015 op <http://www.ugent.be/di/nl/opleidingen>.