**Protocol Werkpakket 1**

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

**Onderzoek in het kader van het IWT LA project 140955**

Laboratorium Virologie

Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie

Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent

Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke

Tel.: +32 9 264 74 02

Email: [sebastiaan.theuns@ugent.be](mailto:sebastiaan.theuns@ugent.be)

Website: [www.rota.ugent.be](http://www.rota.ugent.be)

# Introductie

Diarree is het belangrijkste gezondheidsprobleem bij jonge biggen in de kraamstal en de batterij. De betrokkenheid van het rotavirus tijdens de pathogenese van diarree werd de laatste decennia in Vlaanderen slechts beperkt onderzocht. Daarnaast kan het virus mogelijk geassocieerd worden met groeivermindering in subklinisch geïnfecteerde dieren, met een economische impact tot gevolg. Er bestaan geen goede diagnostische en profylactische maatregelen om problemen door het rotavirus efficiënt te identificeren en te controleren. In een nieuw 4-jaar durend IWT LA project (140955) willen we de klinische en economische impact van rotavirussen op Vlaamse varkensbedrijven bepalen. Vervolgens zullen eenvoudige controlemaatregelen opgesteld worden. Deze zullen bestaan uit verbeterde hygiëneprotocols en het gebruik van voederadditieven met virusneutralizerende eigenschappen. Een eerste specifieke doelstelling (werkpakket 1) van het project is een duidelijk beeld te vormen van de circulatie van rotavirussen op Vlaamse varkensbedrijven en tegelijk hun klinische en economische impact in te schatten. Ook zullen mogelijke predisponerende risicofactoren voor erge rotavirusinfecties geïdentificeerd worden. Dit zal gebeuren door middel van een **longitudinale veldstudie** op **12 Vlaamse varkensbedrijven** met verschillende managementssystemen (wekensystemen), bedrijfsgroottes (aantal zeugen) en profylactische behandelingen na het spenen (geen, colistine, zink oxide). Dit werkpakket zal gecoördineerd worden door Prof. Dr. Hans Nauwynck, Dr. Sebastiaan Theuns, Eleni Van Der Hallen (Laboratorium Virologie, UGent) en Prof. Dr. Dominiek Maes (Vakgroep Bedrijfsdiergeneeskunde, UGent). Biggen zullen opgevolgd worden vanaf de partus tot aan het spenen of vanaf het spenen tot aan het einde van de batterijfase, afhankelijk van de problematiek op het bedrijf. In de kraamstal en de batterij zal de mest kwantitatief gescreend worden voor de aanwezigheid van het rotavirus om zo kinetieken van virale uitscheiding te kunnen opstellen. De ergheid van virale vermeerdering zal vervolgens gecorreleerd worden aan de groei, incidentie van diarree, geneesmiddelenverbruik en mortaliteit bij de biggen. Deze aanpak is internationaal een primeur. Tevens zullen ook een aantal andere belangrijke enterische pathogenen gescreend worden. Er zal ook nagegaan worden of een eenvoudige bloedname aan het begin en einde van de batterijfase kan gebruikt worden om de graad van rotavirus besmetting op het bedrijf te bepalen. Met de resultaten zal een gerichte diagnostische strategie op punt gezet worden, waarmee veehouders objectief kunnen beslissen wanneer profylactische maatregelen tegenover rotavirussen op hun bedrijf moeten ingesteld worden.

# Criteria voor deelname aan de studie uit werkpakket 1

In een eerste fase wensen we bedrijven in te sluiten die een problematiek van diarree hebben in de kraamstal of batterij. Er zal voor deelname een uitgebreide anamnese afgenomen worden. Om in aanmerking te komen dient het bedrijf te voldoen aan de volgende criteria en akkoord te gaan met de volgende voorwaarden:

## Bedrijfsmanagement

* Minstens 250 zeugen op het bedrijf aanwezig
* Volgens een 3 of 4 wekensysteem werken
* Biggen worden tot en met de batterijfase op het bedrijf opgegroeid
* Biggen van nesten in de kraamstal (vanaf een leeftijd van 3 dagen) of de batterij, die ingesloten worden in de studie, worden niet verlegd naar andere nesten tijdens het studieverloop. Er worden tijdens het studieverloop geen nieuwe biggen geïntroduceerd in de nesten die opgevolgd worden, omdat dit de geobserveerde kinetieken van virusuitscheiding kan beïnvloeden.
* Gezien de intensiteit van het studieprotocol (frequentie van bedrijfsbezoeken, zie deel 3) zal de voorkeur gegeven worden aan bedrijven die binnen een redelijke afstand van de Faculteit Diergeneeskunde (Merelbeke) gelegen zijn. Verder gelegen bedrijven zullen in een latere fase van het IWT LA project opgevolgd worden, wanneer het monitoringsvenster minder intensief wordt.

**Gezondheidsbeleid**

* Een geschiedenis van diarreeproblemen in de kraamstal of batterij
* Het vaccineren van gelten/zeugen met geïnactiveerde boviene rotavirus vaccins of geïnactiveerde porciene rotavirus autovaccins is niet toegelaten tijdens de studie; indien het vaccin in het verleden werd gebruikt dan moet de laatste toediening minstens een jaar geleden zijn
* Het gebruik van geïnactiveerde Coli/Clostridium vaccins bij gelten/zeugen is toegelaten tijdens de studie
* Het gebruik van het geattenueerde F4+ E. Coli (Coliprotec) vaccin bij gespeende biggen is niet toegelaten tijdens de studie
* Profylaxie met colistine of zinkoxide ter preventie van speendiarree mag gebruikt worden na het spenen tijdens de studie, maar niet beide producten tesamen; het product, dosering en behandelingsduur worden gecommuniceerd aan de studiecoördinator, tijdens een bedrijfsbezoek
* Het gebruik van pre- en probiotica is toegestaan tijdens de studie, maar het product, dosering en behandelingsduur worden gecommuniceerd aan de studiecoördinator, tijdens een bedrijfsbezoek
* Het gebruik van organische zuren is toegestaan tijdens de studie, maar het product, dosering en behandelingsduur worden gecommuniceerd aan de studiecoördinator, tijdens een bedrijfsbezoek
* Bloedplasma mag gebruikt worden in biggenvoeders voor en na het spenen
* Elke therapeutische geneesmiddelenbehandeling, individueel of in groep, die wordt opgestart tijdens het studieverloop en ter behandeling van ziekte bij één van de dieren, wordt gecommuniceerd aan de coördinator van de studie; de naam van het product, dosis, toedieningroute, behandelingsduur en welk big/nest behandeld werd worden gemeld aan de studiecoördinator, tijdens een bedrijfsbezoek
* Een dier dat sterft en ingesloten was in de studie zal gekoeld (4°C) bewaard worden. De bedrijfsleider contacteert bij voorkeur de studiecoördinator om dit te melden, zodat een autopsie kan uitgevoerd worden om de doodsoorzaak te achterhalen
* De diagnostische analysen die deel uitmaken van het studieprotocol zullen niet aangerekend worden aan de veehouder en vallen ten koste van het project; overige analysen die niet deel uitmaken van het studieprotocol en die op aanvraag van de veehouder of de bedrijfsdierenarts worden ingestuurd, worden niet bekostigd door het project
* De onderzoekers voorzien een weegschaal om de biggen te wegen.

## Voeding

* De bedrijfsleider bezorgt samen met het anamneseformulier een analysecertificaat van de samenstelling van de gebruikte voeders tijdens de kraamstal of batterijfase.
* Tijdens het studieverloop worden er geen wijzigingen doorgevoerd in het voederschema
* Creap feed mag gebruikt worden in de kraamstal, maar de samenstelling wordt gecommuniceerd aan de studiecoördinator, tijdens een bedrijfsbezoek
* Het gebruik van bloedplasmaproducten en (kunst)melk is toegestaan, maar het gebruikte product, concentratie, doelgroep en duur van toediening wordt gecommuniceerd aan de studiecoördinator, tijdens een bedrijfsbezoek

# Het studieverloop

* Wanneer uw bedrijf in aanmerking komt voor deelname aan de veldstudie zal de bedrijfsleider gecontacteerd worden om concrete afspraken te maken voor de studie en een overzicht op te stellen van de data waarop het bedrijf zal bezocht worden en door wie. Op dit moment zal een uitgebreide anamnese afgenomen worden. Op deze dag zal een visuele inspectie uitgevoerd worden van het bedrijf, zodat de planning van de studie kan opgestart worden. Voor bedrijven met een problematiek in de kraamstal zal de studie starten één dag na de partus, terwijl voor de bedrijven met speendiarree problemen deze starten op dag van het spenen.
* Er wordt niet verwacht dat de varkenshouder helpt tijdens het collecteren van de stalen in de hieropvolgende bedrijfsbezoeken.
* Het gebruikte materiaal voor staalname is steriel.
* Het bedrijf zal bezocht worden door Eleni Van Der Hallen (Laboratorium Virologie) op dagen dat er enkel mest moet gecollecteerd worden. Bij de start van de studie en op dagen dat er bloed moet genomen worden en de dieren dienen gewogen te worden zal zij vergezeld worden door Sebastiaan Theuns, Caroline Bonckaert of Zeger Van Den Abeele van het Laboratorium Virologie.

**Bedrijven met problemen in de kraamstal**

* De studie start op dag 1 na de partus om de rust tijdens het werpen en de eerste contacten tussen de zeug en de biggen niet te verstoren. Er zal door de onderzoekers een overzicht gemaakt worden van het aantal biggen dat in ieder nest aanwezig is en de pariteit van de zeugen zal genoteerd worden. Nesten met minder dan 8 levende biggen worden uitgesloten. Vervolgens worden ad random 2 nesten van gelten en 3 nesten van meerworpse zeugen geselecteerd. Hieruit zullen vervolgens ad random 2 biggen per nest geselecteed worden, met uitsluiting van het zwaarste en lichtste big. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren kunnen ingesloten worden. De biggen worden gemerkt met een oormerk dat een uniek nummer bevat en dit nummer wordt onmiddellijk genoteerd op de checklist.
* Er wordt bij ieder bedrijfsbezoek een visuele inspectie uitgevoerd en de resultaten worden op de checklist ingevuld.
* Elk big wordt gewogen (startgewicht) op dag 1 na de partus en net voor het spenen, aan het einde van de studie, om een groeicurve op te stellen en de dagelijkse groei per big te berekenen.
* Rectale swabs worden gebruikt om faeces te collecteren van de ingesloten biggen tijdens ieder bedrijfsbezoek. Van ieder big worden 2 rectale swabs gecollecteerd, waarvan 1 swab op voorhand gewogen werd. Na collectie zullen de swabs voor transport in een gekoelde opslagbox worden gebracht. De mest op de swabs wordt kwantitatief geanalyseerd voor de aanwezigheid van rotavirussen en F4+ *E. coli.* Een swab wordt geënt op een bloedagar *E. coli* te isoleren en hemolyse na te gaan.
* Er zal eveneens mest gecollecteerd worden indien diarree zich voordoet in de nesten die ingesloten werden in de studie. Bij kraamstaldiarree zal een extra analyse voor *Clostridium perfringens* en *Isospora suis* uitgevoerd worden.
* Op bedrijven die spenen op een leeftijd van 21 dagen zullen de bedrijfsbezoeken ingepland worden (9 bezoeken) op 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20 dagen na de partus.
* Op bedrijven die spenen op een leeftijd van 28 dagen zullen de bedrijfsbezoeken ingepland worden (11 bezoeken) op 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20, 24, 27 dagen na de partus.

**Bedrijven met problemen na het spenen**

* De studie start op de dag van het spenen. Er zal voor het spenen een overzicht gemaakt worden van het aantal biggen dat in ieder nest aanwezig is en de pariteit van de zeug zal genoteerd worden om de afkomst van de biggen te kunnen noteren. Nesten met minder dan 8 levende biggen worden uitgesloten. Vervolgens worden ad random 2 nesten van gelten en 3 nesten van meerworpse zeugen geselecteerd. Hieruit zullen vervolgens ad random 2 biggen per nest geselecteed worden, met uitsluiting van het zwaarste en lichtste big. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren kunnen ingesloten worden. De biggen worden gemerkt met een oormerk dat een uniek nummer bevat en dit nummer wordt onmiddellijk genoteerd op de checklist.
* Er wordt bij ieder bedrijfsbezoek een visuele inspectie uitgevoerd en de resultaten worden op de checklist ingevuld.
* Elk big wordt gewogen (startgewicht) op de dagn van het spenen en aan aan het einde van de studie, om een groeicurve op te stellen en de dagelijkse groei per big te berekenen.
* Rectale swabs worden gebruikt om faeces te collecteren van de ingesloten biggen tijdens ieder bedrijfsbezoek. Van ieder big worden 2 rectale swabs gecollecteerd, waarvan 1 swab op voorhand gewogen werd. Na collectie zullen de swabs voor transport in een gekoelde opslagbox worden gebracht. De mest op de swabs wordt kwantitatief geanalyseerd voor de aanwezigheid van rotavirussen en F4+ en F18+ *E. coli.* en voor *Streptococcus suis* bij gespeende biggen.
* Er zal eveneens mest gecollecteerd worden indien diarree zich voordoet in de nesten die ingesloten werden in de studie. Bij speendiarree zal een extra analyse voor *Salmonella spp.* en *Brachyspira spp.* uitgevoerd worden.
* De bedrijven zullen om de 2 dagen bezocht worden tijdens de eerste 2 weken na het spenen en vervolgens om de 4 dagen tot het einde van de batterijfase: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 dagen na spenen (15 bezoeken).
* Op bedrijven waar dit automatisch kan gebeuren zal de voederopname gemeten worden om zo de voederconversie te kunnen bepalen.
* Op de dag van spenen en aan het einde van de batterijfase wordt er 2ml bloed gecollecteerd (roze naald, 5ml spuit, collectie via de vena jugularis) om de specifieke anti-rotavirus antistoffenconcentratie in het serum te bepalen via een IgA en IgG *immunoperoxidase monolayer assay* (IPMA). In samenspraak met de bedrijfsdierenarts kan dit bloed ook voor andere diagnostische onderzoeken gebruikt worden, maar deze analysen worden niet ten koste van het project uitgevoerd.

# Geboden medewerking voor de bedrijfsleider

De onderzoekers zullen een **vergoeding** betalen van **50€ per big** dat ingesloten wordt in de studie ofwel 500€ per bedrijf (10 biggen).

Na afloop van de studie en wanneer alle analysen uitgevoerd werden, zullen de resultaten gecommuniceerd worden via een rapport aan de bedrijfsdierenarts en veehouder. Dit zal mondeling met hem besproken worden en samen met de bedrijfsleider en de bedrijfsdierenarts zullen we nagaan of er acties ondernomen moeten worden om de situatie op het bedrijf te verbeteren. Dit zal bij interesse van de veehouder kunnen deeluitmaken van een vervolgonderzoek uit de werkpakketten 3 en 4 van het IWT LA traject.

Momenteel zijn er geen porciene rotavirus vaccins voorhanden, daarom dringt de ontwikkeling van snel inzetbare effectieve controlemaatregelen zich op. Aan de hand van bedrijfsbezoeken zullen de gebruikte **reinigings- en desinfectieprotocollen** geëvalueerd en verbeterd worden en zullen de bevoegde personen geschoold worden om deze beter toe te passen in de praktijk. De veehouder zal gratis kunnen beschikken over deze reinigings- en desinfectieproducten. Er zal vervolgens geëvalueerd worden of deze ingrepen de rotavirusinfecties, incidentie van diarree, de mortaliteit en het geneesmiddelenverbruik doen afnemen, maar ook of de groei bij de biggen hierdoor verbetert.

Een tweede strategie om rotavirusinfecties te controleren zal bestaan uit het aanwenden van **virusneutraliserende-voederadditieven** in creep feed en speenvoeder. Heden worden vaak plasmaproducten aan de voeders van gespeende varkens toegevoegd. Hun antivirale-werking wordt verondersteld, maar er bestaan geen duidelijke kwaliteitslabels om aan te tonen of bepaalde plasmaproducten in staat zijn om rotavirusinfecties te onderdrukken. Daarom zal een *in vitro* test op punt gezet worden waarmee batches van plasmaproducten of andere voedercomponenten kunnen gescreend worden voor hun rotavirus-neutraliserende eigenschappen. Op deze manier kunnen deze producten voorzien worden van kwaliteitslabels en kan de landbouwer deze gericht gaan aanwenden om rotavirusinfecties in de praktijk te controleren.

Indien het bedrijf wenst deel te nemen aan deze vervolgonderzoeken, dan zal een aparte overeenkomst worden opgesteld tussen de onderzoeksinstelling en het bedrijf.

# Overeenkomst (opgesteld in tweevoud)

**Datum:** ......../......../.............

Ik, ........................................................................ (voornaam + naam), de verantwoordelijke, verklaar goed ingelicht geweest te zijn over het doel, de voorwaarden en het opzet van deze studie en verklaar ermee akkoord te gaan dat mijn bedrijf zal bezocht worden op de data die weergegeven zijn in het studieprotocol en ga akkoord met de staalnames die nodig zijn voor de goede uitvoering van het onderzoek.

De onderzoekers verbinden er zich toe zich te houden aan de bezoeken en staalnames die vermeld staan in het project. Bij afwijkingen hiervan zal eerst de toestemming van de veehouder gevraagd worden. Alle onderzoeken die nodig zijn voor de goede uitvoering van de studie worden kostenloos uitgevoerd. Extra analysen die niet binnen de doelstelling van dit onderzoek vallen en op vraag van de bedrijfsdierenarts of veehouder worden uitgevoerd, zullen aangerekend worden aan de bedrijfsleider. De onderzoekers verbinden zich er toe de resultaten te communiceren aan de bedrijfsleider en de bedrijfsdierenarts en samen met hen een plan uit te werken om de situatie op het bedrijf trachten te verbeteren. De onderzoekers verbinden zich er toe alle noodzakelijke middelen die binnen het project voorzien zijn in te zetten, zonder enige resultaatsverbintenis aan te gaan.

Handtekening voorafgegaand door gelezen en goedgekeurd,

Handtekening verantwoordelijke bedrijf

Handtekening onderzoekers LaboVirologie,

# Contactgegevens

**Laboratorium Virologie**

Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie

Faculteit Diergeneeskunde

Universiteit Gent

Salisburylaan 133

9820 Merelbeke

Prof. Dr. Hans Nauwynck

[Hans.nauwynck@ugent.be](mailto:Hans.nauwynck@ugent.be)

+32 9 264 73 73

Dr. Sebastiaan Theuns

[sebastiaan.theuns@ugent.be](mailto:sebastiaan.theuns@ugent.be)

+32 9 264 75 19

Eleni Van Der Hallen

+32 9 264 75 19

[**www.rota.ugent.be**](http://www.rota.ugent.be) **(in opbouw: online vanaf 14 september)**

**Vakgroep Verloskunde, Voortplanting en Bedrijfsdiergeneeskunde**

Faculteit Diergeneeskunde

Universiteit Gent

Salisburylaan 133

9820 Merelbeke

Prof. Dr. Dominiek Maes

Dominiek.maes@ugent.be