



# BEGRÆNSET GENETISK VARIATION I PRRS OVER TID HOS GRISE I VÆKST

MEDDELELSE NR. 1022

Der var meget lidt genetisk variation blandt de PRRS-virus, som kunne isoleres i 3 danske besætninger i løbet af 6-11 måneder.

---

INSTITUTION: VIDENCENTER FOR SVINEPRODUKTION, DEN RULLENDE AFPRØVNING

FORFATTER: CHARLOTTE SONNE KRISTENSEN

LISE KIRSTINE KVISGAARD, DTU, DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET

CHARLOTTE KRISTIANE HJULSAGER, DTU, DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET

LARS ERIK LARSEN, DTU, DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET

HENRIK THONING

UDGIVET: 17. MARTS 2015

Dyregruppe: Smågrise, Slagtesvin

Fagområde: Veterinær

## Sammendrag

Der var meget lidt genetisk variation blandt de PRRS virus (PRRSV), som blev fundet inden for besætningen i 3 danske smågrise- og slagtesvinebesætninger i løbet af 6-11 måneder. Dette tyder på, at PRRSV i Danmark er mere stabilt og ikke ændre sig (mutere) så meget som det er rapporteret fra USA. Generelt var det svært at påvise PRRSV i besætningerne på trods af mange blodprøver fra forskellige aldersgrupper.

Man kunne i denne undersøgelse ved hjælp af IPT-testen ikke afgøre, om en gruppe af grise ville være PRRSV positive målt ved PCR.

Der indgik 3 uafhængige besætninger i undersøgelsen. Besætning 1 var integreret og Besætning 2 og 3 havde kun smågrise og/eller slagtesvin (vækststyr). I besætningerne blev der, cirka hver anden måned i løbet af 6-7 måneder, taget blodprøve af grise i vækst. Blodprøverne blev undersøgt for PRRSV ved PCR, og fra PRRSV-positive prøver blev PRRSV sekventeret.

I Besætning 1 blev der ved alle 3 blodprøveudtagninger påvist PRRSV. I Besætning 2 blev der ved 2 ud af 3 blodprøveudtagninger påvist PRRSV. I Besætning 3 kun ved 1 ud af 3 blodprøveudtagninger. Sekventeringerne viste, at det var det samme PRRSV, der blev påvist i de enkelte besætninger hver gang der blev isoleret PRRSV.

## Baggrund

Porcint reproduktions- og respirationsvejsvirus (PRRSV) inddeles i to genotyper: type 1 (PRRSV DK) og type 2 (PRRSV US). Inden for hver type findes der mange genetiske varianter (subtyper) af PRRSV. Dette skyldes at PRRSV nemt muterer, det vil sige at genomet ændrer sig. Et andet ord for dette er genetisk drift.

Der er ingen eller kun ringe krydsbeskyttelse mellem forskellige genetiske varianter af virus, dvs. at flere genetiske varianter af PRRSV kan give problemer samtidigt eller med kort tids mellemrum hos de samme grise.

Dette problem ses i dag i USA, hvor man lidt populært siger: hver besætning har sin egen genetiske PRRSV variant. I Danmark er der kun lavet få undersøgelser af genetisk variation i PRRSV, og der er ikke lavet gentagne undersøgelser i den samme besætning over tid. Hvis der er stor genetisk variation i PRRSV kan man risikere at de vacciner, der er på markedet, ikke længere er virksomme, eller at de diagnostiske tests der anvendes hverken påviser PRRSV eller antistoffer mod PRRSV.

Når en dansk besætning skal undersøges for PRRS benyttes hovedsageligt påvisning af antistoffer mod PRRSV og ikke påvisning af selve PRRSV ved PCR. Antistoffer mod PRRSV kan påvises i to forskellige tests: IPT-test og ELISA. I IPT-test kan antistofferne påvises fra 7-10 dage efter infektion og op til 6-10 måneder efter infektion [2]. Det er dog kun de første 3-4 uger efter infektion, at titrene vil ligge højt (over 1250). For ELISA går der 8-14 dage før antistoffer kan påvises, og de kan påvises i op til 2 år [1], [3]. Efter naturlig infektion med PRRSV vil der ved PCR kunne påvises virus i blod og spyt fra grisen fra få dage efter infektion og op til flere uger efter infektion [1], [2].

At påvise selve PRRSV i Danmark er forbundet med afsætningsmæssige udfordringer. Derfor benyttes hovedsageligt IPT-testen til at vurdere om der har været cirkulation af PRRSV blandt en gruppe af grise. Men der er ikke lavet sammenligninger af hvor god IPT-testen er til at afklare, om der har været cirkulation af PRRSV under praktiske forhold.

Formålet med dette projekt var primært at undersøge den genetiske variation i PRRSV i løbet af 6-11 måneder i tre danske besætninger med grise i vækst og sekundært at sammenligne resultater fra IPT-test og PCR-test på grupper af grise.

## Materiale og metode

Der indgik 3 PRRSV-positive besætninger i undersøgelsen. Besætningerne var udvalgt tilfældigt blandt besætninger med formodet PRRSV cirkulation hos grise i vækst.

### *Besætning 1*

Besætningen havde både dansk og amerikansk PRRS samt almindelig- og ondartet lungesyge. Den bestod af 200 søer, en klimastald, som blev fyldt over 4 uger og tømt på en gang, en ungsvinestald med grise fra 15 til 35 kg og en slagtesvinestald. Der blev fravænet 130 grise om ugen til rengjorte klimastalde. Poltene blev vaccineret mod PRRS-DK i leverandørbesætningen og blev sat direkte ind i besætningen.

### *Besætning 2*

Besætningen var deklareret blå SPF med almindelig lungesyge og dansk PRRS i SPF-SuS. Den bestod af sektionerede klimastalde, hvor grisene gik til 30 kg, og sektionerede slagtesvinestalde. Alle stalde blev rengjort før indsættelse af nye dyr. Restgrise blev samlet i en buffersektion. Der blev indkøbt 470 PRRS-negative grise på 7 kg hver anden uge (sobesætningen var fri for PRRSV og deklareret SPF+MYK i SPF-SuS).

### *Besætning 3*

Besætningen havde amerikansk PRRS, samt almindelig lungesyge og Ap12. Den bestod af en sektion til ungdyr, hvor de gik, til de var store nok til at komme i slagtesvinestalden, samt to sektioner til slagtesvin. Hver 14. dag blev der indkøbt 170 grise på 30 kg.

## Udtagning og analyse af blodprøver

Undersøgelsen forløb over 6-11 måneder. I hver besætning blev der udtaget 60 blodprøver pr. gang, 3-4 gange med to til fire måneders mellemrum. Prøverne blev udtaget af de praktiserende dyrlæger i forbindelse med et rådgivningsbesøg og indsendt anonymt til Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet (DTU-VET). En liste over hvornår der blev udtaget prøver i besætningen og blandt hvilken gruppe af grise kan ses i tabel 1.

**Tabel 1.** Fordeling af hvornår der blev taget prøver af hvilken grupper af grise i de tre besætninger der indgik i undersøgelsen.

| Besætning | Prøvegang | Tidspunkt      | Fordeling af prøver   |
|-----------|-----------|----------------|---|
| 1         | Første    | Maj 2012       | 20 prøver fra hver af grupperne 10, 15 og 30 kg   |
|           | Anden     | September 2012 | 10 prøver i hver af grupperne 30, 40, 50, 60, 80 og 100 kg  |
|           | Tredje    | December 2012  | 20 prøver i hver af grupperne 40, 70 og 100 kg  |
|           | Fjerde    | April 2013     | 30 prøver blandt grise på 40 kg, 20 prøver blandt grise på 70 kg og 10 prøver blandt grise på 90 kg |
| 2         | Første    | August 2012    | 20 prøver i hver af grupperne 15, 30 og 50 kg.  |
|           | Anden     | Oktober 2012   | 20 prøver i hver af grupperne 15, 30 og 50 kg.  |
|           | Tredje    | December 2012  | 20 prøver i hver af grupperne 15, 30 og 50 kg.  |
| 3         | Første    | Februar 2013   | 20 prøver i hver af grupperne 50, 70 og 100 kg.   |
|           | Anden     | April 2013     | 20 prøver i hver af grupperne 50, 70 og 100 kg.   |
|           | Tredje    | Juni 2013      | 20 prøver i hver af grupperne 50, 70 og 100 kg.   |

Prøverne blev analyseret for antistoffer mod PRRSV ved IPT-test [2]. Efterfølgende blev prøverne undersøgt for PRRSV ved PCR, i første omgang i pools af 10 prøver, og ved positive pools blev prøverne analyseret enkeltvis. En til fire PCR-positive prøver fra hver prøveudtagning fik efterfølgende sekventeret den del af PRRSV, der kaldes ORF5 [4]. Sekventering er en aflæsning af den genetiske kode udtrykt af det enkelte PRRSV. Dette bruges til at bestemme hvilket virus, der helt præcist findes i besætningen. PRRSV sammenlignes med en referencestamme for henholdsvis PRRSV type 1 og type 2. For PRRSV type 1 er referencestammen PRRS-vaccinen Porcilis® PRRS VET (Porcilis) og for PRRSV type 2 er det PRRS-vaccinen Ingelvac® PRRS VET (Ingelvac).

PRRSV-sekvenserne sættes ind i et fylogenetisk træ, som gør det muligt at se, hvor tæt beslægtede de sekventerede PRRSV er (svarer til et stamtræ). Det er inddelingen i grupper og længden af de vandrette grene, der viser, hvor ens de enkelte PRRSV er. Jo mere ens jo mindre genetisk variation.

Sammenhængen mellem PCR-positive grupper og resultater fra IPT-test på samme gruppe af grise blev analyseret. Analysen blev fortaget ved hjælp af en logistisk regression (proc glimmix) med "PCR pool" som outcome og grænsen for IPT-testen som forklarende variabel. Besætning indgik som random effekt. Frihedsgraderne for testen blev estimeret ved hjælp af "Satterthwaite" ved en Fishers exact test. I første omgang blev grænsen for IPT-testen sat til, at hvis mindst en gris i gruppen havde IPT-værdi  $\geq 50$ , var gruppen af grise positiv. Derefter blev analysen kørt yderligere to gange, hvor grænsen for IPT var henholdsvis  $\geq 250$  og  $\geq 1250$  for at undersøge om en højere IPT-grænse ville gøre det nemmere at afgøre om der havde været cirkulation af PRRSV.

# Resultater og diskussion

## Sekventering af PRRSV

På trods af mange blodprøver, i alt 620 stk., i forskellige aldersgrupper af grise i vækst, blev der ved PCR fundet PRRSV i overraskende få grupper af grise. I Besætning 1 blev der påvist PRRSV ved hver prøveudtagning, i Besætning 2 kun to gange og i Besætning 3 kun en gang.

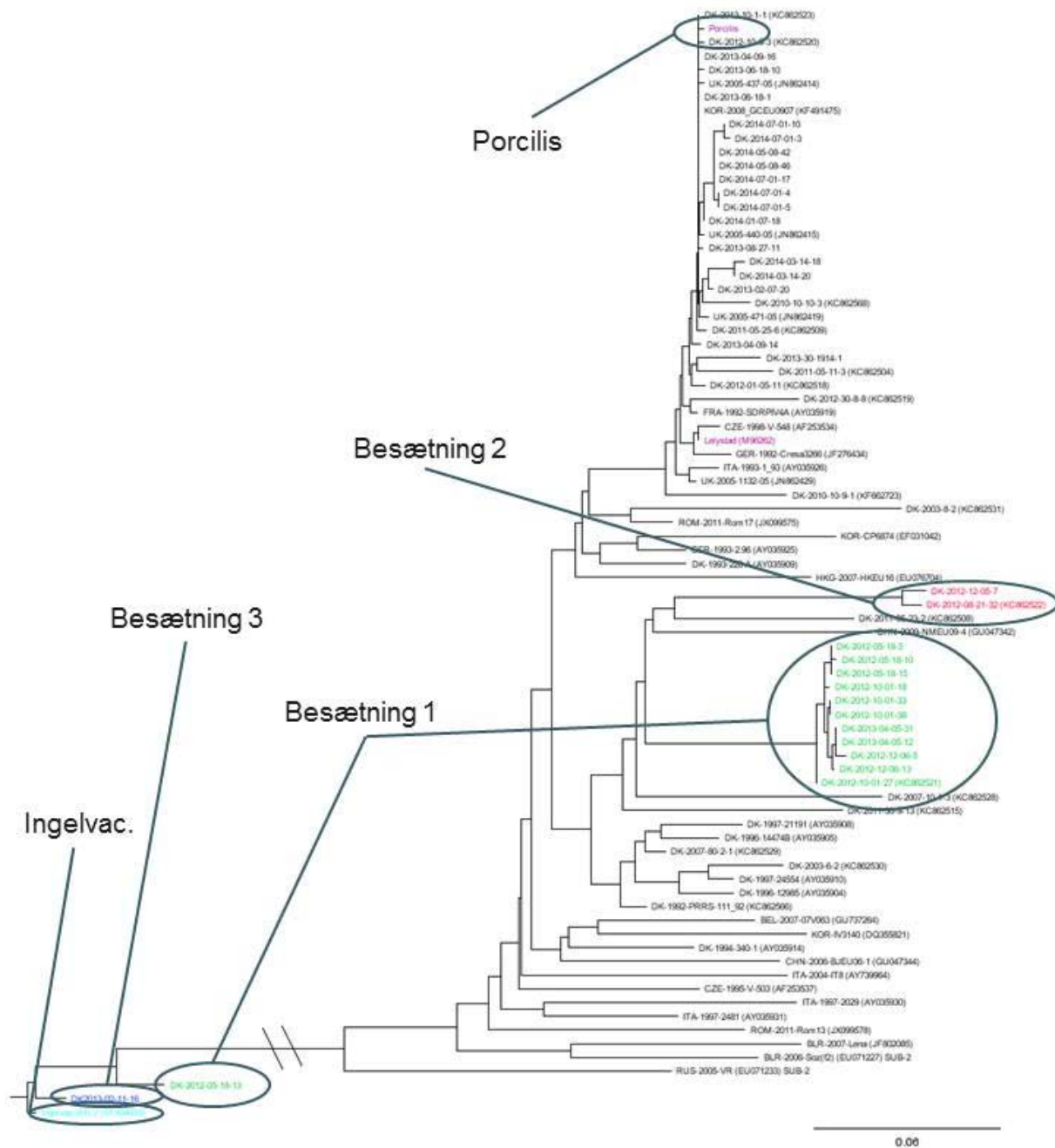
I Besætning 1 blev der ved den første prøveudtagning både sekventeret PRRSV type 1 og PRRSV type 2. De sidste 2 gange blev der kun fundet PRRSV type 1. Der var meget lidt genetisk variation i det PRRSV, som blev sekventeret over tid i besætningen. Dette ses ved at ”% identisk til Porcilis” ved prøveudtagningerne i Besætning 1 ligger mellem 86,5-87 % (tabel 2).

**Tabel 2.** Sekventering af PRRSV over tid i 3 besætninger angivet som henholdsvis ”% identisk med Porcilis” for type 1 og ”% identisk med Ingelvac” for type 2. Jo tættere værdierne for ”% identisk med Porcilis” er indenfor en besætning, jo mere ens er de PRRSV der isoleres i besætningen.

| Sekventering af PRRSV |                                  |                                  |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                       | % identisk med Porcilis (type 1) | % identisk med Ingelvac (type 2) |
| Besætning 1           |                                  |                                  |
| Maj 2012              | 86,6 %, 86,8 % og 86,8 %         | 95,5 %                           |
| September 2012        | 86,8 %, 86,8 %, 87 % og 87 %     |                                  |
| December 2013         | 86,5 % og 86,8 %                 |                                  |
| April 2013            | 86,8 % og 86,8 %                 |                                  |
| Besætning 2           |                                  |                                  |
| August 2012           | 84,65 %                          |                                  |
| December 2012         | 84,16 %                          |                                  |
| Besætning 3           |                                  |                                  |
| Februar 2013          |                                  | 98,51 %                          |

I Besætning 2 blev der kun isoleret PRRSV ved PCR 2 gange. Også dette PRRS-virus varierede meget lidt over tid (tabel 2). I Besætning 3 blev der kun påvist PRRS-virus første gang, der blev taget prøver (tabel 2).

I det fylogenetiske træ ses, at de PRRSV, der er sekventeret indenfor en besætning, ligger meget tæt på hinanden (figur 1). Dette tyder på, at PRRSV i Danmark er meget stabilt og ikke muterer så meget som i USA [5] og Østeuropa [6], [7].



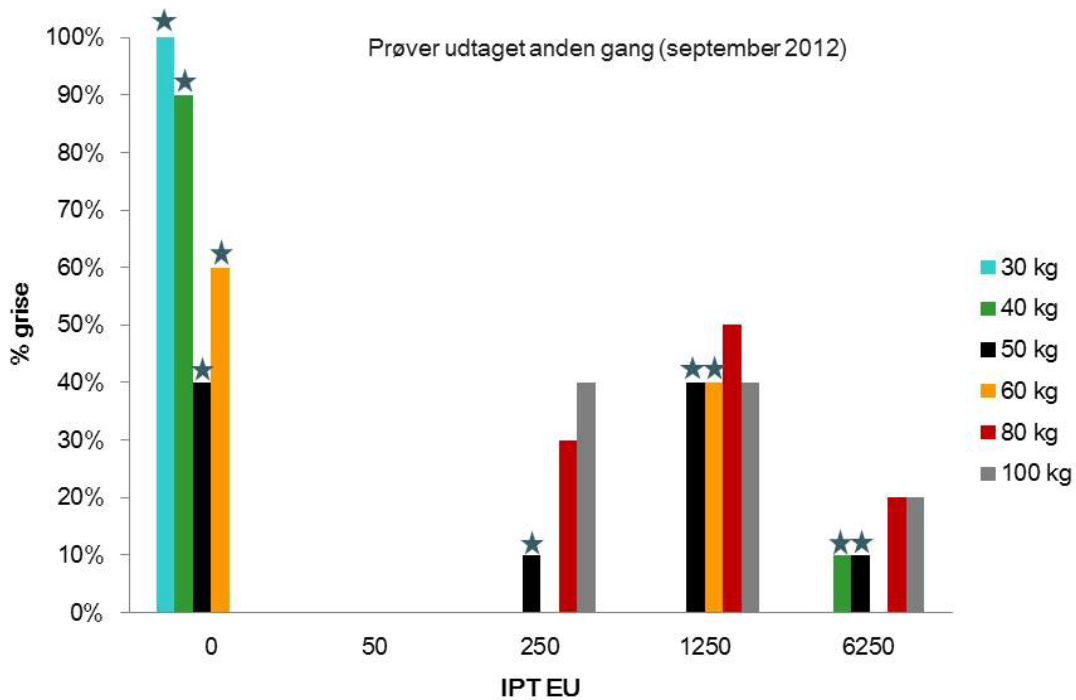
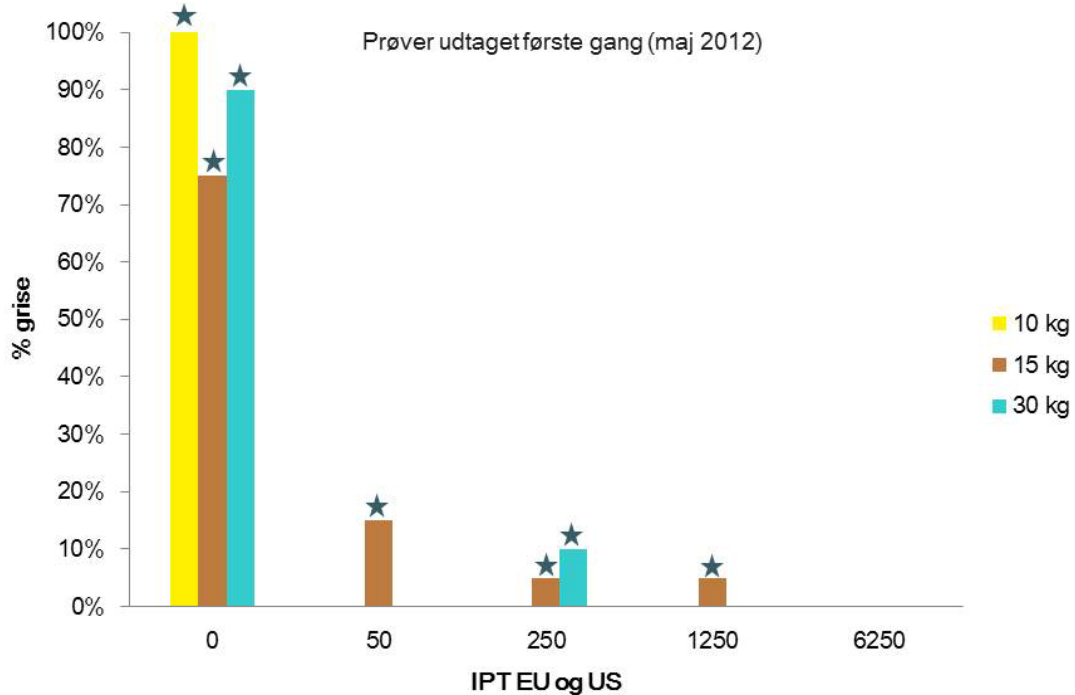
**Figur 1.** Fylogenetisk træ over PRRSV type 1 og type 2 isoleret rundt omkring i verden. Grøn er Besætning 1, rød Besætning 2 og blå Besætning 3. Med lilla er angivet referencestammen "Porcilis".

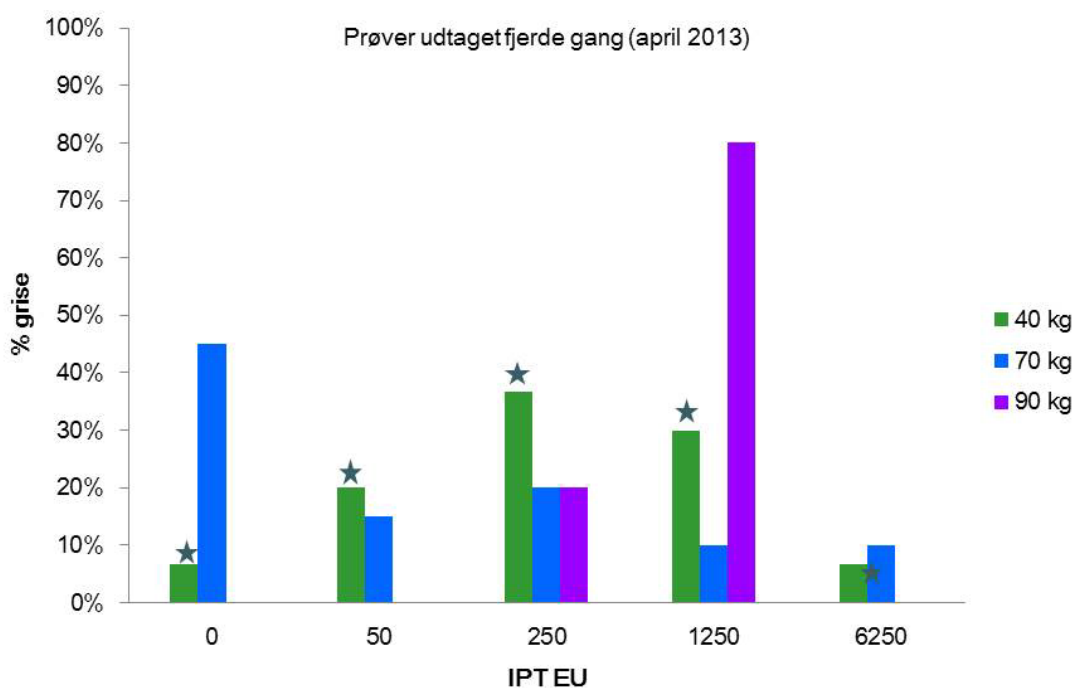
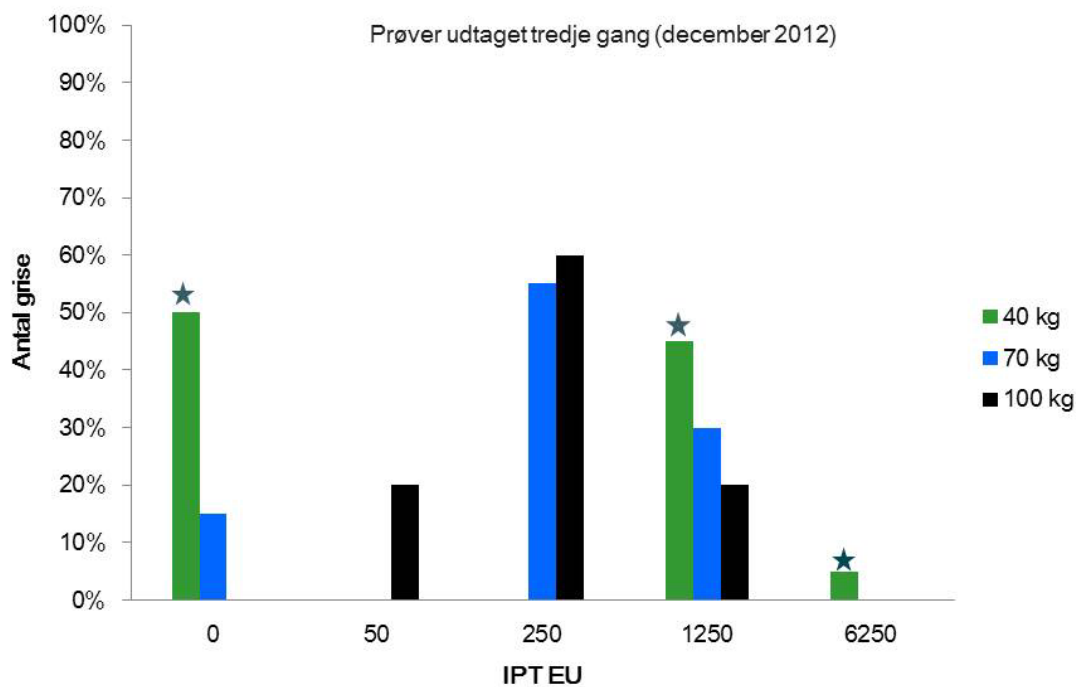
## Sammenhæng mellem påvisning af PRRSV ved PCR og IPT

I Besætning 1 havde meget få grise antistoffer mod PRRSV i maj 2012 (figur 2). Alligevel kunne der påvises PRRSV i alle tre aldersgrupper. Dette kan tyde på, at grisene var smittet inden for den sidste uge inden prøvedtagningen og derfor ikke havde nået at udvikle antistoffer. I september 2012 havde meget få unge (30-40 kg) grise antistoffer målt ved IPT, men de var alligevel PCR-positive. De ældre grise (50-60 kg) lå højt i IPT og var PCR-positive, og de ældste grise (80-100 kg) lå højt i IPT men var negative i PCR. Igen et billede på, at grisene smittes tidligt, og på trods af høje IPT-værdier blandt

grise på 80-100 kg (1250-6250), er det sandsynligvis ikke i den aldersgruppe PRRSV cirkulerer. Ved de sidste to prøveudtagninger var det kun grise på 40 kg, der var positive i PCR og en del grise havde høj IPT, hvilket tyder på, at grisene var smittet med PRRSV inden for de sidste par uger inden prøveudtagningen (figur 2).

Besætning 1





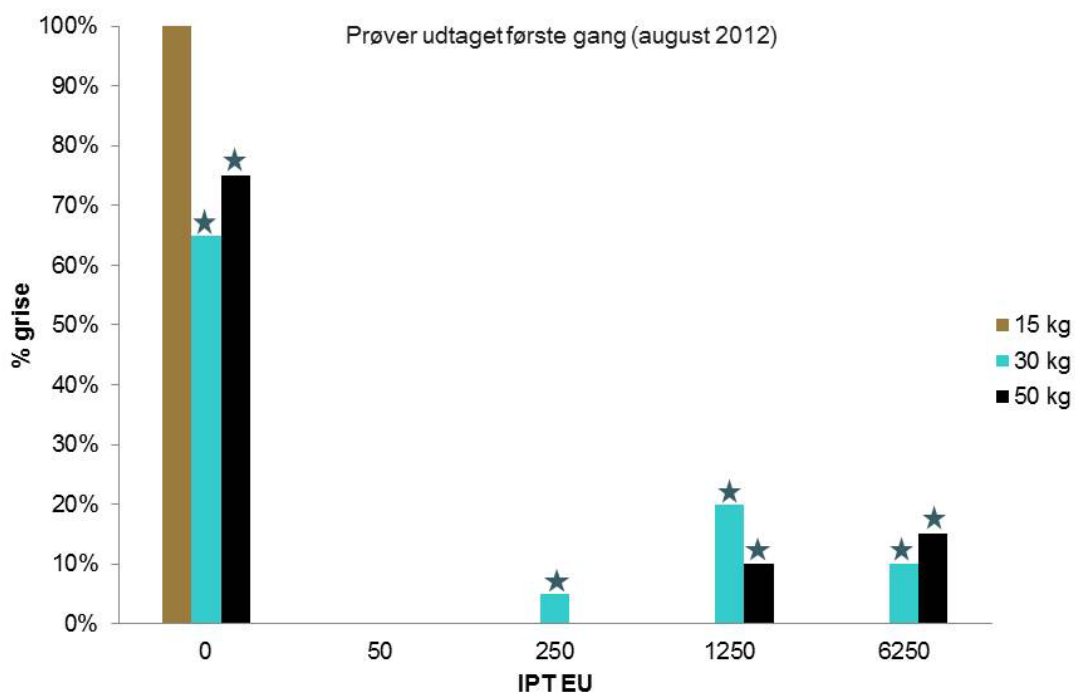
**Figur 2.** Antistoffer mod PRRSV målt ved IPT i Besætning 1. Figuren viser andelen af grise i % med hhv. IPT-værdi 0, 50, 250, 1250 og 6250 for hver prøvegang og for hver aldersgruppe. Stjerne \* angiver at der er påvist PRRSV ved PCR i den vægtgruppe af grise.

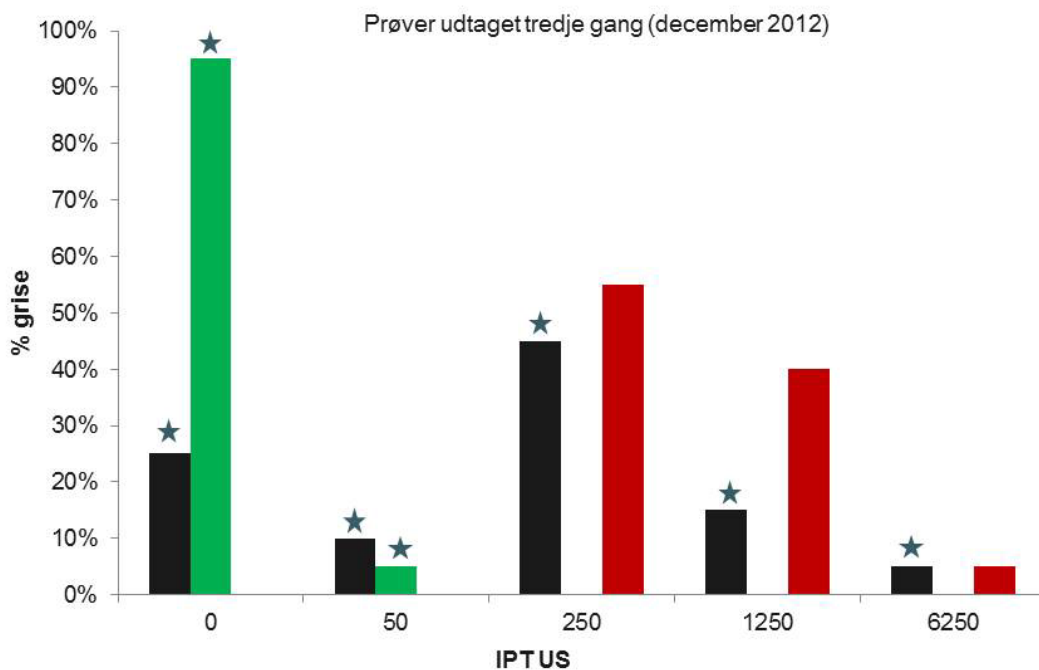
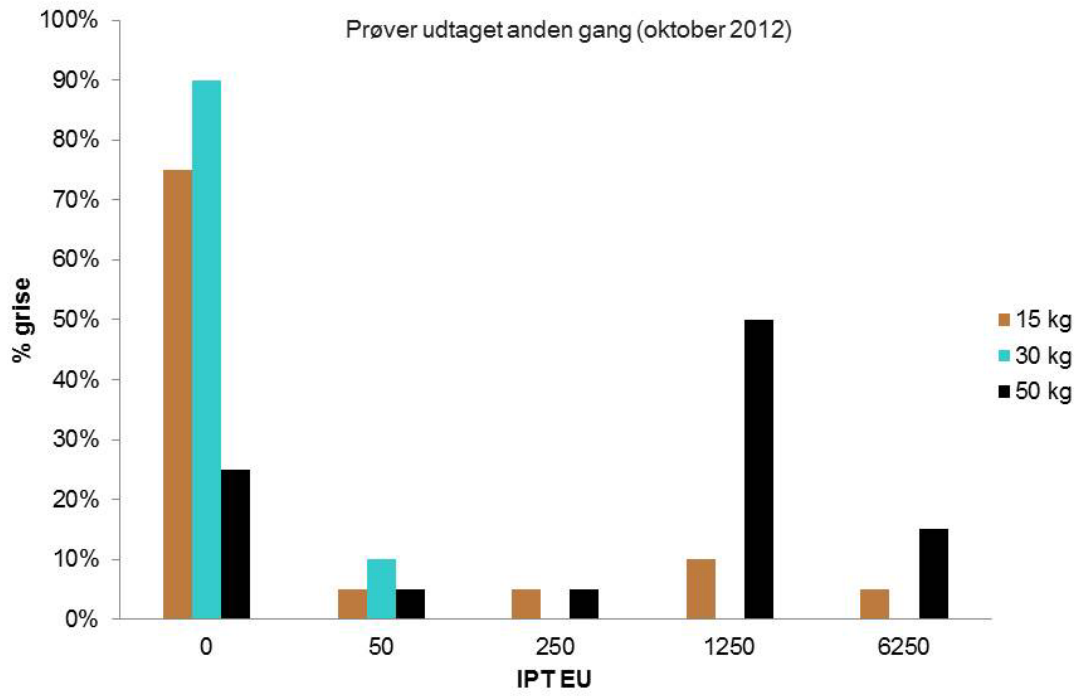
I Besætning 2 havde få grise antistoffer mod PRRSV i IPT-testen første gang, der blev taget prøver (figur 3). Kun grupper på 30 og 50 kg havde enkelte med IPT-værdier på 1250-6250, resten var negative. Da prøverne samtidig var positive for PRRSV ved PCR, kunne det tyde på en helt akut smitte inden for den sidste uge inden prøveudtagningen. Anden gang blev der ikke påvist PRRSV ved PCR, selvom der igen var positive dyr i IPT-testen. Tredje gang var det desværre ikke muligt, at



identificere vægten på de individuelle grise, der havde fået taget blodprøver. I en af grupperne var grisene negative i IPT-testen men fik påvist PRRSV ved PCR. Grisene var altså smittet med PRRS meget kort tid inden prøveudtagningen og havde ikke nået at danne antistoffer. En gruppe havde blandede IPT-værdier og fik påvist PRRSV ved PCR, hvilket tyder på, at de var smittet 2-3 uger tidligere. Den sidste gruppe havde også høje IPT-værdier ( $\geq 250$ ), men der kunne ikke isoleres PRRSV, hvilket tyder på at grisene var smittet med PRRSV mere end 3 uger tidligere. Alle grise på 15 kg var negative i IPT, men der blev påvist PRRSV ved PCR, så grisene er sandsynligvis smittet inden for den sidste uge inden prøveudtagningen. Grise på 30 kg var også positive i PCR og havde værdier fra 0-6250 i IPT.

#### Besætning 2



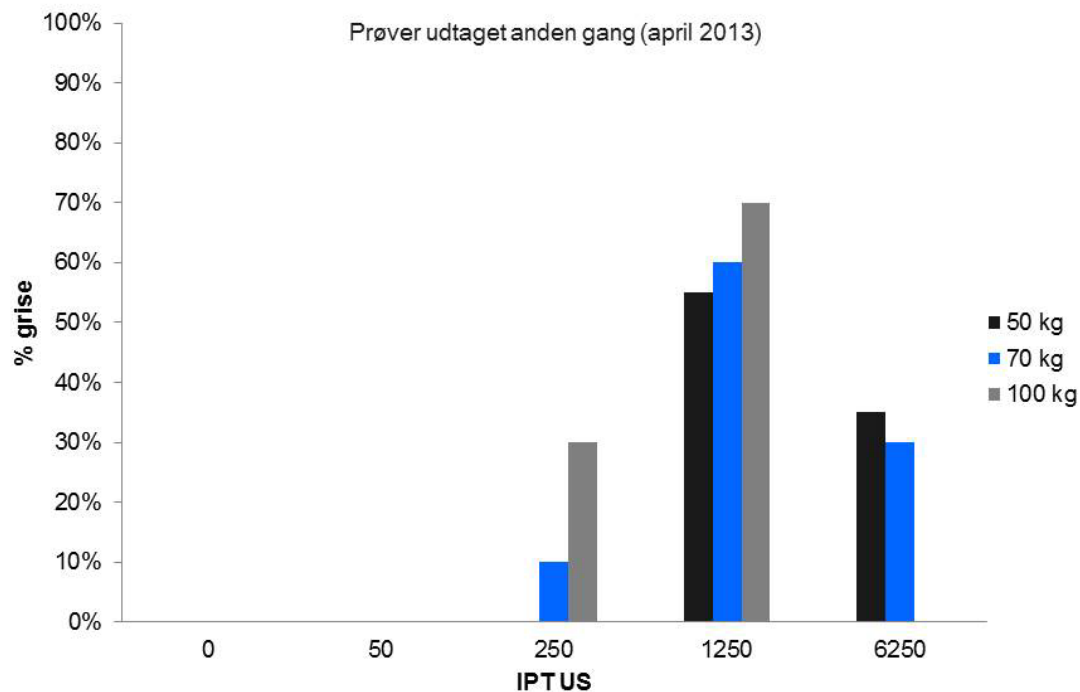
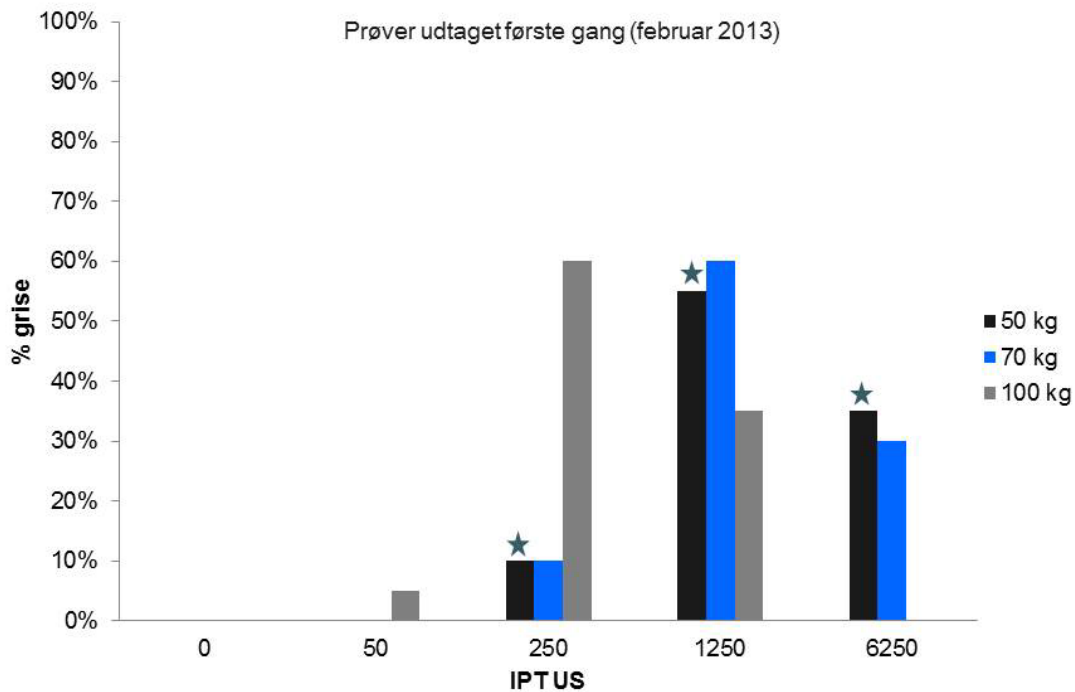


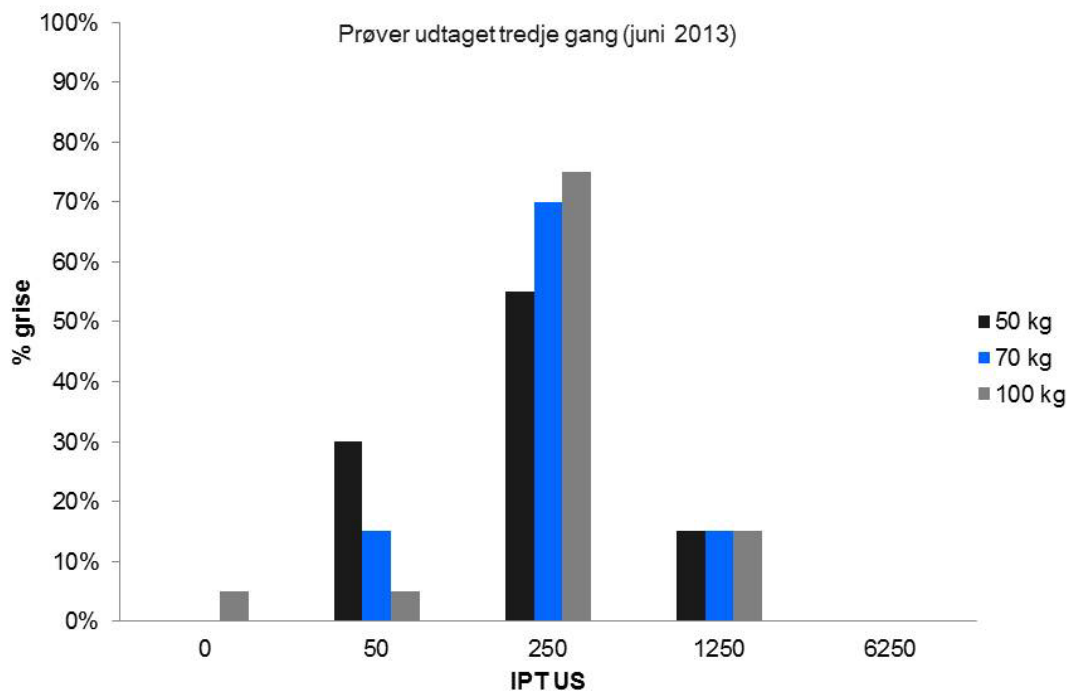
**Figur 3.** Antistoffer mod PRRSV målt ved IPT i Besætning 2. Figuren viser andelen af grise i % med hhv. IPT værdi 0, 50, 250, 1250 og 6250 for hver prøvegang og for hver aldersgruppe. Stjerne \* angiver at der er påvist PRRSV ved PCR i den vægtgruppe af grise. Desværre var det ikke muligt i december 2012 at relatere prøverne til grisens vægt.

Grisene i Besætning 3 havde antistoffer mod PRRSV type 2 målt ved IPT (figur 4). Ved første og anden prøveudtagning var IPT-værdierne høje (1250-6250), ved tredje prøveudtagning var de fleste prøver kun på 250 i IPT. Der blev kun påvist PRRSV ved PCR den første gang, det på trods af at IPT-værdierne også var høje anden gang. PRRSV type 2 giver generelt højere værdier i IPT end PRRSV type 1. Dette kan forklare de meget høje værdier, på trods af, at PRRSV ikke kunne påvises.

Grisene er højst sandsynligt blevet smittet i den usektionerede ungsvinestald, det vil sige før de kom i slagtesvinestalden.

### Besætning 3





Figur 4. Antistoffer mod PRRSV målt ved IPT i Besætning 3. Figuren viser andelen af grise i % med hhv. IPT værdi 0, 50, 250, 1250 og 6250 for hver prøvegang og for hver aldersgruppe. Stjerne \* angiver at der er påvist PRRSV ved PCR i den vægtgruppe af grise.

Det ser generelt ud til, at man ud fra IPT-testen har svært ved at afgøre, om der cirkulerer PRRSV i en gruppe af grise.

En samlet opgørelse over fordelingen af PRRSV-positive grupper, målt ved PCR og resultatet af IPT-testen kan ses i tabel 3.

**Tabel 3.** Fordelingen af antal positive prøver ved henholdsvis PCR-test og IPT-test.

| IPT-test                   | PCR-test |         | P-værdi* |
|----------------------------|----------|---------|----------|
|                            | Negativ  | Positiv |          |
| Mindst en gris $\geq 50$   | 36       | 30      | 0.09     |
| Mindst en gris $\geq 250$  | 34       | 28      | 0.15     |
| Mindst en gris $\geq 1250$ | 33       | 25      | 0.48     |

\* Sammenligning af den aktuelle grænseværdi med øvrige værdier

Den statistiske analyse viste, at det ikke var muligt ud fra IPT-værdien, at afgøre om der kunne påvises PRRSV ved PCR i en gruppe af grise, dette hverken ved en grænse for IPT-testen på  $\geq 50$  ( $p=0,09$ ),  $\geq 250$  ( $p=0,15$ ) eller  $\geq 1250$  ( $p=0,48$ ). Desværre var der for få observationer til at det var muligt at undersøge om antallet af dyr med høj IPT i en gruppe kunne sige noget om risikoen for at PRRSV cirkulerede.

# Konklusion

Der var meget lidt genetisk variation blandt de PRRS-virus (PRRSV), som blev fundet indenfor besætningen i 3 danske slagtesvinebesætninger i løbet af 6-11 måneder. Dette tyder på, at PRRSV i Danmark er meget mere stabilt og ikke muterer så let inden for en besætning som i eksempelvis USA. Generelt blev der påvist meget lidt PRRSV i besætningerne på trods af mange blodprøver fra forskellige aldersgrupper.

Man kunne i denne undersøgelse ved hjælp af IPT-testen ikke afgøre, om en gruppe af grise ville være PRRSV-positive målt ved PCR.

# Referencer

- [1] Bøtner, A., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet. Microbiol.*, 40, 351-360.
- [2] Nielsen, T.L., Nielsen, J., Have, P., Bækbo, P., Hoff-Jørgensen, R., Bøtner, A., 1997. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol*, 54, 101-112.
- [3] Sørensen, K.J., Strandbygaard, B., Bøtner, A., Madsen, E.S., Nielsen, J., Have, P., 1998. Blocking ELISA's for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol*, 60, 169-177.
- [4] Kvisgaard, L. K., Hjulsager, C. K., Kristensen, C. S., Lauritsen, K. T., & Larsen, L. E., 2013. Genetic and antigenic characterization of complete genomes of Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome viruses (PRRSV) isolated in Denmark over a period of 10 years. *Virus Research*, 178, 197–205. doi:10.1016/j.virusres.2013.10.009; 10.1016/j.virusres.2013.10.009
- [5] Shi, M., Lam, T.T., Hon, C.C., Murtaugh, M.P., Davies, P.R., Hui, R.K., Li, J., Wong, L.T., Yip, C.W., Jiang, J.W., Leung, F.C., 2010. Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol*, 84, 8700-8711.
- [6] Stadejek, T., Stankevicius, A., Murtaugh, M.P., Oleksiewicz, M.B., 2013. Molecular evolution of PRRSV in Europe: Current state of play. *Vet. Microbiol*, 165, 21-28.
- [7] Balka, G., Hornyak, A., Balint, A., Kiss, I., Kecskemeti, S., Bakoonyi, T., Rusvai, M., 2008. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. *Vet Microbiol*, 127, 128-135.

Afprøvning nr. 1363  
Aktivitetsnr.: 075-420030

//PB//

---

## VIDENCENTER FOR SVINEPRODUKTION

Tlf.: 33 39 45 00  
Fax: 33 11 25 45  
[vsp-info@seges.dk](mailto:vsp-info@seges.dk)



Ophavsretten tilhører Videncenter for Svineproduktion. Informationerne fra denne hjemmeside må anvendes i anden sammenhæng med kildeangivelse.

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

Videncenter for Svineproduktion er således i intet tilfælde ansvarlig for tab, direkte såvel som indirekte, som brugere måtte lide ved at anvende de indlagte informationer.

---