

UDBRUD AF PRRS1 PÅ EN PRRS-SEROPOSITIV ORNESTATION EFTERFULGT AF ET EKSPERIMENTIELT FORSØG

Charlotte Sonne Kristensen^a, Lise K. Kvisgaard^b, Charlotte K. Hjulsager^c, Jesper Schak Krog^c og Lars E. Larsen^b

^a SEGES Svineproduktion, ^b Københavns Universitet (KU), ^c Statens Serum Institut (SSI)

STØTTET AF

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

Otte orner blev fundet PRRSV1-positive ved PCR på en PRRS-seropositiv ornestation. Efter at have tappet en sædprøve blev de otte orner straks aflivet. Der blev ikke påvist PRRSV1 i sædprøverne fra de otte orner, men PRRSV1 blev påvist i testikler/bitestikler fra to af de otte orner. Et efterfølgende eksperimentelt forsøg viste, at både blod og sæd fra ornerne kunne inficere fravænningsgrise med PRRSV1, når det blev sprøjtet direkte ind i bughulen. Forsøget bekræfter derfor, at det ikke er muligt at fri-teste sæd med PCR ved direkte test af sæden, og at undersøgelse af blod fra orner ved PCR giver en mere følsom evaluering af smittepotentiale via sæd. At grise kunne inficeres med sæd, der er testet PRRSV-negativ ved PCR, er ikke bevis for, at søer kan smittes under praktiske forhold. Der blev efterfølgende heller ikke påvist smitte til sobesætninger, som havde modtaget sæd fra ornestationen.

Sammendrag

Otte orner blev fundet PRRSV1-positive ved PCR af blodprøver fra alle orner på en PRRS-seropositiv ornestation i marts 2020. På trods af at sæden fra de otte orner var negativ for PRRSV ved PCR-undersøgelse, kunne sæden i et eksperimentelt forsøg inficere fravænningsgrise med PRRSV1, når det blev sprøjtet direkte ind i bughulen. Forsøget bekræfter derfor, at det ikke er muligt at fri-teste sæd for PRRSV ved PCR ved direkte test af sæden, og at undersøgelse af blod ved PCR giver en mere følsom evaluering af smitterisiko via sæd.

Efter at PRRSV1 blev påvist på en PRRS-seropositiv ornestation, blev alle orner testet, og otte PRRSV1-positive orner blev påvist. Ornerne blev fundet PRRSV1-positive ved test af blod men ikke ved test af sæd. Hos to af de otte orner blev PRRSV1 påvist i testikel/bitestikel ved PCR. To

besætninger var efterfølgende under mistanke for at være smittet med PRRSV1 fra ornestationen. Genetisk karakterisering af PRRSV1 fra de to besætninger kunne dog afkræfte dette.

I et eksperimentelt forsøg var det muligt at inficere fravænningsgrise med PRRSV1, enten ved at sprøjte blod fra de otte orner eller sæd fra fire af ornerne ind i bughulen på grisene. At grise kunne inficeres med sæd, der er testet PRRSV-negative ved PCR, er ikke bevis for, at søer kan smittes under praktiske forhold.

Baggrund

Porcin reproduktion og respiratorisk syndrom (PRRS) er en smitsom sygdom, der skyldes PRRS-virus (PRRSV), som findes i to typer, PRRSV1 og PRRSV2 [1]. Efter smitte med PRRSV er der en inkubationsperiode på en-fire dage, og grisene er derefter viræmiske i blodet i fire-otte uger [2] og i sæd op til 13 uger [3]. Mens grisen er viræmisk, kan den udskille PRRSV via sekreter (snyt, urin, sæd og gødning) [2,3,4]. PRRSV kan smitte via sæd [5,6], men generelt er undersøgelse af sæd mindre følsomt end blod, når det skal afgøres, om en orne er smittet med PRRSV i det akutte stadie. Der påvises også PRRSV i lavere niveauer i sæd sammenlignet med blod [6]. Der findes ingen undersøgelser af, om PRRSV-negativ sæd fra orner, der er PRRSV-positive i blod, kan smitte andre grise.

Siden PRRSV kom til Danmark i 1992, har der været et PRRS-seronegativt og et PRRS-seropositivt KS-system. Tanken bag det PRRS-seropositive system er at vaccinere ornerne mod PRRSV, så man kunne bevare det genetiske materiale, hvis en avlsbesætning blev smittet med PRRSV. I det PRRS-seropositive system vaccineres ornerne mod både PRRSV1 og PRRSV2, efterfulgt af en karantæneperiode på mindst 90 dage. Efter udbrud af PRRS på en PRRS-seronegativ ornestation i 2019 blev det besluttet at intensivere overvågningen af PRRS-seropositive ornestationer, så ornerne for det første skal være negative for PRRSV ved PCR, før de indsættes på ornestationen. For det andet skal ugentlige blodprøver udtages fra en stikprøve af ornerne til undersøgelse for PRRSV ved PCR. En PRRS-seropositiv ornestation fik 3. marts 2020 udtaget 21 rutinemæssige blodprøver til overvågning for PRRSV. Prøverne blev analyseret for PRRSV ved PCR som fire pools af fem blodprøver og en enkelt blodprøve på Center for Diagnostik, Danmarks Tekniske Universitet (DTU). Resultaterne viste, at den ene pool og den orne, der blev testet som enkeltprøve, var svagt positiv for PRRSV1, og ornestationen blev straks lukket. Resultatet blev efterfølgende bekræftet ved PCR-tests af alle prøverne enkeltvis, udført på det nationale referencelaboratorium, Statens Serum Institut (SSI).

Formålet med denne undersøgelse er at beskrive udbruddet af PRRSV på ornestationen i marts 2020 og præsentere resultater fra et eksperimentelt smitteforsøg med materiale fra orner fra ornestationen.

Materialer og metoder

På den PRRS-seropositive ornestation blev der 5. marts, to dage efter, der var konstateret PRRSV1 smitte på stationen, udtaget blodprøver fra alle 112 orner, der var opstaldet i samme sektion som de orner, der var PRRSV-positive 3. marts. Prøverne blev undersøgt for PRRSV enkeltvis ved Rt-qPCR (PCR) [7]. 7. og 16. marts blev der udtaget blodprøver fra samtlige orner på stationen. Disse blodprøver blev i første omgang undersøgt for PRRSV1 i pools af fem ved PCR. Efterfølgende blev prøverne fra positive pools analyseret enkeltvist. Blodprøverne blev undersøgt på SSI.

De orner, der blev fundet PRRSV-positive, fik tappet sæd og blev herefter aflivet. Efter aflivning blev testiklerne og bitestikler udtaget. Sæd og testikler/bitestikelvæv blev undersøgt for forekomst af PRRSV ved PCR. Sæd blev undersøgt på SSI og testikler på Sektion for Veterinær Klinisk

Mikrobiologi, Forskningsgruppe for Enzootiske og Zoonotiske virus, Københavns Universitet (KU).
Den anvendte cut-off var 40.

Fra den orne, der indeholdt mest PRRSV1, blev der udført en genetisk karakterisering af dele af PRRSV1-genomet på KU.

Smitte til besætninger

Efter at have modtaget sæd fra ornestationen fik to besætninger mistanke om smitte med PRRSV1. Der blev udført en genetisk karakterisering af PRRSV1 fra hver af de to besætninger, og virussekvensen blev efterfølgende sammenlignet med PRRSV1 isoleret på ornestationen.

Smitteforsøg med materiale fra ornestationen.

For at undersøge, om blod og sæd fra de PRRSV1-positive orner fra ornestationen kunne føre til PRRSV-infektion i grise, blev der i isolationsstaldene på KU gennemført et smitteforsøg. Der blev indkøbt 24 grise ved fravæning (7 kg) fra en PRRSV-negativ besætning. Ved ankomst til forsøgsstedet blev grisene inddelt i tre grupper med otte grise i hver. Hver af de tre grupper blev opstaldet i separate stalde (Tabel 1).

Tabel 1. Fordeling af grise samt behandling i smitteforsøget med PRRSV.

Gruppe	Antal grise	Antal inokulerede grise	Antal kontaktgrise	Materiale til inokulering
1	8	6	2	Serum fra alle otte PRRSV-positive orner fra ornestationen
2	8	6	2	Sæd ¹ fra fire PRRSV-positive orner fra ornestationen (orne 1-4)
3	8	6	2	Serum fra PRRSV1-viræmiske grise (PRRSV-varianten fra Horsens)

¹Sædprøverne var testet negative for PRRSV ved PCR, men ornerne var testet PRRSV-positiv via blodprøve.

Syv dage efter ankomst blev seks af grisene inokuleret i bughulen med materiale fra de aflivede orner (gruppe 1 og 2) eller med et positivt kontrol PRRSV1 isolat (gruppe 3). De sidste to grise i hver gruppe blev ikke inokuleret men fungerede som kontaktgrise til de inokulerede grise.

Udtagning og undersøgelse af prøver

Der blev udtaget blodprøver af alle grise før inokulation og efterfølgende tre gange om ugen efter inokulering samt ved aflivning i uge 3.

Der blev udtaget næsesvabere dagligt fra alle grisene i de første fem dage efter inokulation og derefter tre gange ugentligt efter inokulering frem til aflivning i uge 3.

Serumprøver og næsesvabere blev testet for PRRSV1 ved PCR samt for antistoffer mod PRRSV1 ved ELISA.

Observationer

Grisene blev observeret dagligt for tegn på klinisk sygdom, og temperaturen blev målt de første fem dage efter inokulering og herefter ved tegn på sygdom.

Aflivning og post mortem undersøgelse

Alle grisene blev aflivet tre uger efter inokulering. Der blev foretaget en overordnet inspektion af grisen, og patologiske fund blev beskrevet.

Der blev udtaget tonsiller (mandler) samt lungevæv fra alle grise ved obduktionen. Vævsprøverne blev undersøgt for PRRSV1 ved PCR.

Resultater og diskussion

PRRSV1 blev påvist i overvågningsprøver fra to orner fra en PRRS-seropositiv ornestation. Prøverne var udtaget 3. marts 2020 (Tabel 2).

Opfølgende blev der 5. marts udtaget prøver fra 112 orner fra samme sektion. Ved denne undersøgelse test blev der påvist PRRSV1 i yderligere to orner (Tabel 2).

Ved undersøgelse af blodprøver fra samtlige tilbageværende 251 orner på stationen udtaget 7. marts blev der fundet fire nye PRRSV1-positive orner. Det totale antal af PRRSV positive orner kom derved op på otte (Tabel 2).

Test af blodprøver fra alle 331 tilbageværende orner 16. marts viste, at alle prøver var negative for PRRSV1. Herefter blev stationen åbnet igen.

Tabel 2. PRRSV1-positive orner identificeret på en PRRS-seropositiv ornestation.

Orne	Dato blodprøve	Baggrund for udtagning af blodprøve	Blodprøve PCR (CT)	Sæd PCR
1	3. marts	Rutineovervågning	37	Negativ
2	3. marts	Rutineovervågning (positiv pool og positiv re-test enkeltprøver)	38	Negativ
3	5. marts	Samme sektion som orne 1	34	Negativ
4	5. marts	Samme sektion som orne 1	40	Negativ
5	7. marts	Test hele station	35	Negativ
6	7. marts	Test hele station	39	Negativ
7	7. marts	Test hele station	39	Negativ
8	7. marts	Test hele station	36	Negativ

Der kunne ikke påvises PRRSV i sædprøverne fra nogen af de PRRSV-positive orner (Tabel 2). Ved undersøgelse af væv fra testikler og bitestikler blev der påvist PRRSV1 ved PCR hos Orne 1 og Orne 8. Påvisning af PRRSV i testikel/bitestikelvæv er dog ikke ensbetydende med, at PRRSV vil overføres til sæden [5].

Genetisk analyse af PRRSV1-genomet fra virus påvist i Orne 3 viste stor lighed (ca. 98 %) med stamme, der er i vaccinen Porcilis® PRRS MLV. Der findes ikke data, der viser, i hvor høj grad Porcilis® PRRS MLV-vaccinestammen kan ændre sig i de enkelte dele af genomet, når den cirkulerer i længere tid mellem vaccinerede individer. Dog har vi i et tidligere projekt vist, at Porcilis-vaccinestammen ændrede sig 1,2 % i løbet af 11 måneder [8]. Derfor er det muligt, at PRRSV fra Orne 3 er opstået fra Porcilis® PRRS MLV-vaccinestammen ved længere tids cirkulation mellem ornerne på selve ornestationen. Der er dog også relativ stor lighed mellem PRRSV1 fra Orne 3 og danske "feltvirus", så det kan heller ikke udelukkes, at PRRSV fra Orne 3 er et "feltvirus", der er blevet introduceret på ornestationen, uafhængigt af vaccinationerne.

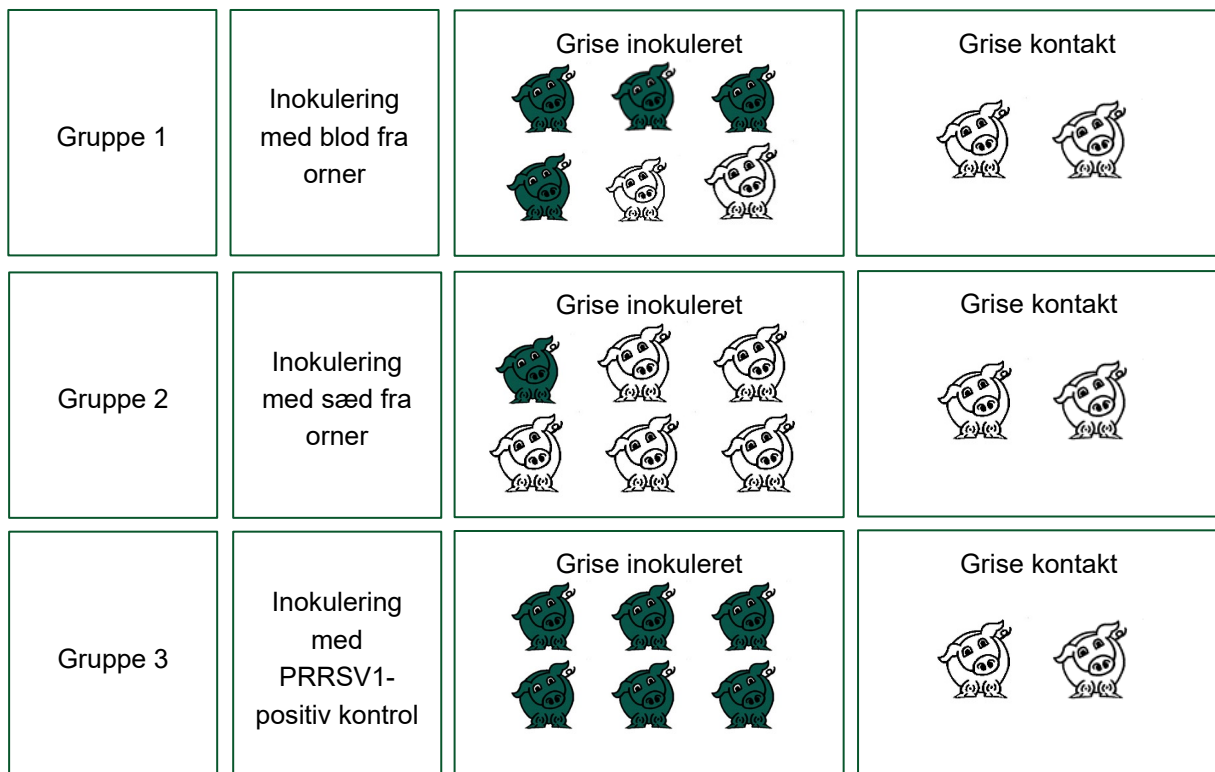
Ingen smitte til besætninger

Sæd fra ornestationen var mistænkt for at være årsag til smitte med PRRS i to besætninger. Den genetiske karakterisering af PRRSV viste imidlertid, at virus i disse to besætninger var anderledes end virus påvist på ornestationen. Det kunne på den baggrund ikke bekræftes, at besætningerne var smittet via sæd fra ornestationen.

Blod og sæd fra ornestationen kunne inficere grise

Der blev ikke observeret PRRSV-relaterede kliniske tegn i grisene efter inokulation af PRRSV i bughulen, og der var heller ikke nogen signifikant stigning i rektal temperatur.

Det var muligt at smitte grise med PRRSV1 efter inokulering i bughulen. I gruppe 1, som blev inokuleret med blod fra PRRSV1 PCR-positive orner, blev PRRSV påvist i fire ud af seks grise som også efterfølgende dannede antistoffer mod PRRSV. I gruppen inokuleret med sæd, som var testet negativ for PRRSV1 med PCR, men tappet fra orner der havde fået påvist PRRSV1 i blodet ved PCR, var der en gris som testede positiv for PRRSV i blodet og dannede antistoffer mod PRRSV. I kontrolgruppen med grise, som blev inokuleret med PRRSV1 isolatet fra Horsens blev alle seks inokulerede grise PRRSV1-positive (Figur 1).



Figur 1. Grise PRRSV1-positive (🐷) eller negative (🐷) efter inokulering med materiale fra PRRSV1-positive orner eller grise.

Alle de grise, der blev testet PRRSV1-positive på blodprøver, havde på et tidspunkt en PRRSV1-positiv næsesvaberprøve, men generelt var meget få næsesvaberprøver PRRSV1-positive sammenlignet med blodprøver. I den positive kontrol gruppe sås spredning til kontaktgrisene, mens dette ikke var tilfældet i de to andre grupper. Det kan skyldes, at der kun blev påvist lave mængder af virus i næsesvabere fra grisene i gruppe 1 og 2.

En gris inokuleret med sæd blev PRRSV1-positiv. Dette på trods af at sæden var testet PRRSV1-negativ, selvom blodet var testet PRRSV1-positiv. Dog blev der fra én af de orner, hvor sæden indgik i inokulummet, Orne 1, påvist PRRSV1 i testikelvæv. Resultatet tyder på, at selv virus i mængder under den grænse, der kan påvises ved PCR, er nok til at smitte en gris under de eksperimentelle forhold, hvor inokulummet sprøjtes direkte ind i bughulen på grisen. Dette er ikke ensbetydende med, at en PRRSV-negativ sædprøve kan smitte under praktiske forhold, hvor sæden fortyndes og behandles samt udsættes for immunforsvaret i børen hos den so, der insemineres.

Aflivning og post mortem undersøgelse af grisene

Ved obduktion sås der ingen makroskopiske forandringer i grisene.

Fra samtlige grise, der var testet PRRSV1-positive i blodprøver, blev der påvist PRRSV1 i både tonsiller og lungevæv ved PCR. Alle grise, der var negative i blodprøverne, var ligeledes negative i tonsiller og lungevæv. Der var derfor intet, der tydede på smitte til kontaktgrisene, som kun var nået til tonsillerne og ikke gået over i blodbanen.

Konklusion

I alt otte orner blev fundet PRRSV1-positive ved PCR på en PRRS-seropositiv ornestation. Alle orner blev aflivet straks efter påvisning af PRRSV1. Der blev ikke påvist PRRSV1 i sædprøver fra de otte orner, men fra to orner blev der påvist PRRSV1 i testikler/bitestikler. Et efterfølgende eksperimentelt forsøg viste, at både blod og sæd fra nogle af ornerne kunne inficere fravænningsgrise med PRRSV1, når det blev sprøjtet direkte ind i bughulen på grisene.

Forsøget bekræfter derfor, at det ikke er muligt at fri-teste sæd med PCR ved direkte test af sæden, og at undersøgelse af blod ved PCR giver en mere følsom evaluering af smittepotentiale via sæd.

Referencer

- [1] Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol.* 1995;140:1451–60.
- [2] Kristensen, C.S., Kvisgaard, L., Palowski, M., Holmegaard, S., Hjulsgaard, C.K., Heegaard, P., Bøtner, B., Stadejek, T., Haugegaard, S., Larsen, L.E. 2017. Efficacy of single versus double vaccination with modified live vaccines against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus types 1 and 2 in pigs. *Vaccine* 27-NOV-2017 DOI information: 10.1016/j.vaccine.2017.11.059
- [3] Plut, J., Jamnikar-Ciglenecki, U., Stukelj, M. (2020), Molecular detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus 2 and hepatitis E virus in oral fluid compared to their detection in faeces and serum. *BMC Veterinary Research.* 16:164. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02378-4>
- [4] Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Chase, C.C.L., Yaeger, M.J., Benfield, D.A., (1995). Persistence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Serum and Semen of Adult Boars. *J Vet Diagnostic Investigation*, 7;4, pp. 456-465.
- [5] C. Prieto 1, P. Suárez 1, I. Simarro 1, C. García 1, S. Martín-Rillo 2, J.M. Castro 1, 1997. Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, 47, 3, 647-654.
- [6] A. Wasilk, J. D. Callahan, J. Christopher-Hennings, T. A. Gay, Y. Fang, M. Dammen, M. E. Reos, M. Torremorell, D. Polson, M. Mellencamp, E. Nelson, W. M. Nelson, 2004. Detection of U.S., Lelystad, and European-Like Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses and Relative Quantitation in Boar Semen and Serum Samples by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*, 42, 4453-4461.
- [7] Wernike, K., Bonilauri, P., Dauber, M., Errington, J., LeBlanc, N., Revilla-Fernández, S., Hjulsgaard, C., Isaksson, M., Stadejek, T., Beer, M., Hoffmann, B., 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: interlaboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection methods. *J Vet Diagn Invest*, 24, 5, 855-866
- [8] Kristensen, C.S., Kvisgaard, L.K., Larsen, L.E., Hjulsgaard, C.K., Thoning, H., 2015. Mislykket forsøg på at sanere en besætning med smågrise og slagtesvin for PRRSV ved brug af vaccine. *Svineproduktion.dk. Meddelelse 1017.*

NAV nr.: 1170

Dyreforsøgsgodkendelse nr. 2019-15-0201-00353

//KMY//

Dyregruppe: Søer, orner, smågrise

Fagområde: Veterinær

Nøgleord: PRRSV, PRRS. PRRS-virus, smitteforsøg, sæd



Tlf.: 33 39 45 00

svineproduktion@seg.es.dk

Ophavsretten tilhører SEGES. Informationerne fra denne hjemmeside må anvendes i anden sammenhæng med kildeangivelse.

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

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