

PRRS OVERLEVER DÅRLIGT I GYLLE

Kasper Pedersen^a, Charlotte Sonne Kristensen^a, Bjørn Lorenzen^a

^a SEGES Svineproduktion

STØTTET AF

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

Risikoen for smitte med PRRSV gennem gylle vurderes at være lav. Infektiøse koncentrationer af PRRSV overlever i kortere tidsperioder i gylle afhængig af omgivelsernes pH og temperatur.

Sammendrag

Hurtig inaktivering af frit PRRSV, i relation til den koncentration af PRRSV, som er nødvendig for at smitte en gris, gør, at risikoen for smitte via gylle vurderes at være lav.

Infektiøse koncentrationer af PRRSV overlever i gylle kun i kortere tidsperioder, helt afhængig af omgivelsernes pH og temperatur. Ved lave temperaturer eller i frostgrader har PRRSV en lang halveringstid på op til flere måneder og i varme perioder inaktiveres det hurtigt.

Da gylle oftest dels vil være opsamlet over en længere tidsperiode og dels vil være betydeligt fortyndet, anses det for mindre sandsynligt, at der udbringes infektiøse koncentrationer af PRRSV på markerne.

Forsuring af gyllen ned til pH 5,5 inden udbringelse kan anvendes til at nedbringe risikoen for udlægning af smitsomt PRRSV.

I forbindelse med saneringer for PRRSV er det vigtigt, at alle retningslinjer for håndtering af gylle overholdes. En opsummering af den indtil nu beskrevne viden om stabiliteten af PRRSV under forskellige miljøforhold samt eksempler på påvisning af PRRSV i gylle/fæces ligger til grund for denne vurdering.

Baggrund

Smitte med Porcin Reproduktions og Respiratorisk Syndrom Virus (PRRSV) til PRRS-negative besætninger sker ofte via introduktion af nye grise, via luften eller via overførsel med sæd [1,2,3,4,5]. Grise udskiller imidlertid også PRRSV via urin [6] og fæces [7], hvormed disse materialer teoretisk set må betragtes som en potentiel kilde til smitte imellem både andre grise og besætninger.

Formålet med dette notat er at opsummere den indtil nu beskrevne viden om påvisning af PRRSV i gylle og fæces med henblik på at vurdere den potentielle smitterisiko via gylle, og at beskrive håndteringen af gylle i forbindelse med en sanering.

Materialer og metoder

For at opnå en gennemgående og systematisk søgning af eksisterende forskning i PRRSV-detektion i fæces anvendtes gentagne søgninger med forskellige kombinationer af ord. Ordene bestod af hhv. "swine OR pig OR porcine", "feces OR faeces OR fecal OR manure", "PRRSV OR PRRS OR Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome". Søgekriterierne blev kombineret ved hjælp af "AND"-funktionen i databasen.

For at fremsøge flest mulige artikler om emnet, blev søgekriterierne kombineret forskelligt. Søgemaskinerne Ovid og Web of Science blev primært anvendt.

De fundne artikler gav desuden anledning til brug af aktiv søgning, og yderligere essentielle referencer for notatet blev derfor fremsøgt. Endeligt er relevante artikler gennemgået i henhold til formålet med notatet, hvorefter resultat- og diskussionsafsnittet er sammenfattet på baggrund disse.

Beskrivelsen af håndtering af gylle i forbindelse med sanering er hentet fra www.spfsus.dk.

Resultater og diskussion

Fæces eller gylle?

Indledningsvist er det vigtigt at nuancere, hvilket medie, der reelt behandles ved brug af termerne gylle og fæces (Eng.: manure and feces). Dette af to årsager: litteraturen er ikke konsistent i den anvendte praksis ved brug af denne term, og fæces er *ikke* kontamineret med eksempelvis urin eller spyt, hvilke også kan være kilde til smitte med PRRSV. Fæces bør i sig selv kun anvendes i det tilfælde, at der tages en svaberprøve direkte fra rektum (endetarmen), som i tilfælde ved det tidligste fund af PRRSV i fæces tilbage i 1992. Via fæcessvaber fra søer blev der påvist PRRSV 2-9 dage efter, at søerne var inokuleret med PRRSV2 ($10^{5.3}$ TCID₅₀) via trynen [7]. Hvis stibundsprøver ligger til grund for prøvematerialet bør termen gylle-/stibundsprøver (Eng.: manure) i stedet anvendes, da fæces i dette tilfælde potentielt og højst sandsynligt vil være blandet med andre materialer såsom urin, spyt, foder, vand og støv, der alle kan være kontamineret med PRRSV fra et andet sted i grisen end tarmsystemet. For eksempel er PRRSV RNA (PRRSV's arvemateriale) detekteret i stibundsprøver fra 11 uger gamle grise [8]. Grisene er på samme tidspunkt positive for PRRSV i såvel blod som spyt, hvormed det påviste PRRSV i stibundsprøverne potentielt kan komme fra andre steder end tarmsystemet. Alligevel anvender studiet termen fæces for prøvematerialet. PRRSV er derudover fundet med en anseelig koncentration i netop fæcesprøver fra smågrise vaccineret med en levende svækket vaccine (Porcilis PRRS MLV) fra en til tre uger efter vaccination [9]. I samme studie blev PRRSV ofte fundet i fæces i op til tre uger efter eksperimentel (5×10^6 PFU/mL $\sim 7 \times 10^6$ TCID₅₀/mL) smitte.

PRRSV overlevelse i gylle

Tidligt efter opdagelsen af PRRSV bestod et virologisk studie i at beskrive stabiliteten af PRRSV1 i et vækstmedium ved forskellige pH- og temperaturniveauer [10]. Dette er fortrinsvis relevant med henblik på at være bekendt med potentialet for den videre smitte med PRRSV. Den mest optimale stabilitet for PRRSV1 i relation til pH blev vurderet til pH 6,25 (+4° Celsius), hvor halveringstiden ($T_{1/2}$) var cirka 50 timer. Ved den samme temperatur var PRRSV1 mindst stabil ved pH 8,5 ($T_{1/2}$: 33,3 timer) og pH 5,0 ($T_{1/2}$: 18,8 timer). Ved en højere temperatur på +37° Celsius var den optimale pH 6,0 med en $T_{1/2}$ på 6,25 timer [10].

Det viser sig altså, at ikke kun pH, men også temperatur, har betydning for stabiliteten af PRRSV. PRRSV er nærmest stabilt ved hård frost, da det kun reducerer niveauet af PRRSV med 1 log TCID₅₀ ved -70° Celsius og -20° Celsius efter seks måneder, og derefter ikke reduceres mere ved -70° Celsius og kun med 0,5 log TCID₅₀ ved -20° Celsius i yderligere seks måneder [10]. I tabel 1 ses et sammenfattet skema med halveringstider for forskellige temperaturer fra tre studier, hvor PRRSV er opbevaret i forskellige medier.

Tabel 1. Halveringstiden for PRRSV ved forskellige temperaturer og medier: VM: vækstmedium fra Lelystad Virus-inficerede kulturer, gylle (stibundsprøver) eksperimentelt kontamineret med PRRSV (Leung's Lineage 1, sublineage 5 group) og MEM1: Leung's Lineage 1, sublineage 5 group på cellekulturmedium, MEM2: Estimeret gns. ud fra cellekulturmedium med ATCC VR-2332, JA142, MN-184, Ingelvac® PRRS ATP vaccine virus [BoehringerIngelheim Vetmedica Inc., St. Joseph, MO]. I Bloemraad et al. 1994 er regressionen en funktion af tid til udregning af log virustitre (y). pH var i alle studier 7,5.

Temperatur, °C	Medium	Halveringstid, timer	95 % CI	Regression	Studie
4	VM	139,00	-	Y = -0,361*X+6,39	Bloemraad et al. 1994 (10)
4	Gylle	112,60	103,20; 123,80	$T_{1/2} = \exp^{(9.617-0.132 \times \text{temp})}$	Linhares et al. 2012 (11)
4	MEM1	120,50	113,30; 128,60	$T_{1/2} = \exp^{(9.747-0.124 \times \text{temp})}$	Linhares et al. 2012 (11)
4	MEM2	155,50	130,50; 180,50	$T_{1/2} = 243,54 * e^{-0,109 * \text{temp}}$	Jacobs et al. 2010 (12)
10	MEM2	84,80	59,40; 110,20	$T_{1/2} = 243,54 * e^{-0,109 * \text{temp}}$	Jacobs et al. 2010 (12)
20	MEM2	27,40	16,90; 37,90	$T_{1/2} = 243,54 * e^{-0,109 * \text{temp}}$	Jacobs et al. 2010 (12)
21	VM	20,00	-	Y = -0,015*X+6,23	Bloemraad et al. 1994 (10)
22	Gylle	14,60	12,60; 17,20	$T_{1/2} = \exp^{(9.617-0.132 \times \text{temp})}$	Linhares et al. 2012 (11)
22	MEM1	24,50	20,90; 29,50	$T_{1/2} = \exp^{(9.747-0.124 \times \text{temp})}$	Linhares et al. 2012 (11)
30	MEM2	1,60	1,00; 2,20	$T_{1/2} = 243,54 * e^{-0,109 * \text{temp}}$	Jacobs et al. 2010 (12)
37	VM	3,00	-	Y = -0,099*X+5,91	Bloemraad et al. 1994 (10)
43,5	Gylle	1,60	1,50; 1,70	$T_{1/2} = \exp^{(9.617-0.132 \times \text{temp})}$	Linhares et al. 2012 (11)
43,5	MEM1	1,70	1,50; 1,90	$T_{1/2} = \exp^{(9.747-0.124 \times \text{temp})}$	Linhares et al. 2012 (11)
56	VM	0,10	-	Y = -0,047*X+5,66	Bloemraad et al. 1994 (10)
63	Gylle	0,05	0,035; 0,073	$T_{1/2} = \exp^{(9.617-0.132 \times \text{temp})}$	Linhares et al. 2012 (11)
63	MEM1	0,14	0,13; 0,17	$T_{1/2} = \exp^{(9.747-0.124 \times \text{temp})}$	Linhares et al. 2012 (11)
80	Gylle	0,0060	0,0050; 0,0075	$T_{1/2} = \exp^{(9.617-0.132 \times \text{temp})}$	Linhares et al. 2012 (11)
80	MEM1	0,0098	0,0068; 0,018	$T_{1/2} = \exp^{(9.747-0.124 \times \text{temp})}$	Linhares et al. 2012 (11)

I relation til formålet med dette notat er det relevant at vide, hvilken pH, gylle har. I et nyere studie blev stibundsprøver målt til pH 7,5 [11], imens et andet studie fandt, at pH-prøver fra en gylletank var markant mere basiske med en pH på 8,8 [12]. Linhares et al. [11] undersøgte netop halveringstiden for PRRSV i disse med henblik på at vurdere risikoen for smitte med PRRSV gennem gylle/fæces. Ved de afprøvede temperaturer viste halveringstiden sig ikke at være meget forskellig fra den tidligere angivne i Bloemraad et al. 1994, som anvendte et vækstmedium. Et af studiets styrker er, at det detekterer PRRSV via virusisolation i stedet for anvendelse af en kvantitativ PCR. PRRSV er opbygget af RNA, som er relativt stabilt ved høje temperaturer, og således repræsenterer PCR-positive prøver ikke nødvendigvis en infektiøs tilstand af PRRSV. Dette eksemplificeres efter, at der fandtes infektiøst PRRSV ved virusisolation i gylleprøver (pH 8,8) hver dag i otte dage ved 4° Celsius og slet ikke ved 20° Celsius [11]. Ved begge temperaturer fandtes PRRSV i gylle ved PCR i tolv dage efter podning [12]. Linhares et al. (2012) fandt et eksponentielt fald i den infektiøse tilstand af PRRSV i fæces som en funktion af stigende temperatur ($T_{1/2} = \exp^{(9.617-0.132 \times \text{temp})}$) identisk med fundet i andre studier [10,13]. Som følge heraf vurderes, at det vil tage 3,6 måneder ved 5° Celsius at gennemføre 20 halveringstider i gylle, hvormed der således er sket en reduktion fra 10⁶ TCID₅₀/mL til 10⁻¹ TCID₅₀/mL (en tilsvarende reduktion vil ses efter 15 dage ved 20° Celsius) [11]. Denne vurdering er identisk med tidligere fund, hvor en betydelig (5 log TCID₅₀) reduktion i virustiter skete efter 13 uger (3 måneder) ved +4° Celsius og efter 2 dage ved +37° Celsius via en lineær inaktiveringshastighed [10]. I henhold til Husdyrgødningsbekendtgørelsen [14] må der i Danmark udbringes flydende husdyrgødning fra 1. februar. I februar er gennemsnitstemperaturen i Danmark omkring 1,1° Celsius

(2006-2015, DMI) [15], og i så fald vil halveringstiden under eksperimentelle forhold være cirka 10 døgn. Lokale temperaturforhold kan selvfølgelig gøre halveringstiden i februar længere.

Hvor meget PRRSV skal der til for at smitte?

Den laveste koncentration af PRRSV i gylle, der skal til for at smitte en gris (minimum infektive dosis) via en per oral eksponering, er ukendt [10,11]. Den vurderes dog at være meget højere end $10^{1,5}$ TCID₅₀ [10,12,16]. For aerosoltransmission vurderes den infektive dosis at være minimum $10^{0,25}$ TCID₅₀/mL [17]. Det lader imidlertid til, at niveauet i miljøet skal være over 10^3 TCID₅₀, eftersom denne koncentration gav anledning til, at fravænningsgrise blev smittet med PRRSV i et eksperimentelt forsøg. I forsøget gik grisene to timer i et rum, som var kontamineret med PRRSV via bestøvning ($>10^3$ TCID₅₀). Andre grise blev ikke inficeret ved niveauer på $<10^3$ TCID₅₀ [18]. I et lignende eksperimentelt forsøg blev otte grise på ti uger udsat for bestøvning fra under spalterne, med gyllemateriale tilsat PRRS-virus, for at efterligne det, grisene kan udsættes for ved udslusning af gylle. Dosis var 2×10^4 TCID₅₀ [12]. Tre af grisene blev smittet med PRRSV.

Smitte med PRRSV via gylle

PRRSV fra fæces eller gylle må altså indtil videre antages for værende en potentiel kilde til smitte oftest inden for kortere tidshorisonter. Den omgivende temperatur og mediets pH er herunder altafgørende for længde af tidsperiode til inaktivering af PRRSV. I koldere perioder af året kan inaktiveringen således forlænges betydeligt. Ved forsurening af gylle nedbringes pH til omkring 6 og helst helt ned på 5,5 [19], hvilket teoretisk set vil medvirke til at nedbringe halveringstiden af eventuel PRRSV i gyllen og dermed over tid inaktivere dette PRRSV. I praksis reduceres koncentrationen af PRRSV betydeligt i henhold til de store volumener, der behandles, ligesom gylles ofte oplagres over mange måneder. Det må derfor betragtes som usandsynligt, at der udbringes infektiøse koncentrationer af PRRSV via gylle på danske marker. Hvis der dog gør, skal grisene i det videre forløb præsenteres for dette PRRSV. I det tilfælde, at gyllens partikler - herunder PRRSV - ikke opslæmmes i luften og præsenteres i form af aerosoler, betinger det, at vektorer, som andre dyr, insekter eller mennesker, mekanisk overfører PRRSV-kontamineret materiale til grisenes miljø. Da gylle nu om dage enten lægges ud med slæbeslanger eller nedfældes, vurderes aerosoldannelse og efterfølgende eksponering via luften at være særdeles lav. Den samlede vurdering for PRRSV-smitte via gylle vurderes således også at være lav, hvilket bakkes op af den præsenterede forskning, herunder [12].

Håndtering af gylle i forbindelse med en PRRS-sanering

Ved totalsanering af en SPF-besætning tømmes gyllekummerne så vidt det er muligt. Restgyllen behandles med hydratkalk i forholdet 30 kg/m³ restgylle. Ved delsanering for PRRSV kan gyllekummerne ikke tømmes, og der foretages ikke nogen særskilt behandling af den gylle, der står i kummerne. Det bør undgås, at der opstår gylleoversvømmelse, da eventuel PRRSV i gyllen således præsenteres for grisene og dermed kan kompromittere delsaneringen. Ved udslusning af gylle fra stalden er det ligeledes vigtigt at undgå tilbageskyl og udveksling af gylle imellem de enkelte sektioner, da dette teoretisk set vil medføre en risiko for smitte med PRRSV via gyllepartikler.

Konklusion

Hurtig inaktivering af frit PRRSV, i relation til den koncentration af PRRSV, som er nødvendig for smitte af en gris gør, at risikoen for smitte gennem gylle vurderes værende lav. Infektiøse koncentrationer af PRRSV overlever i gylle i kortere tidsperioder afhængig af omgivelsernes pH og temperatur.

Ved lave temperaturer eller i frostgrader har PRRSV en halveringstid på op til flere måneder, men da gylle oftest dels vil være opsamlet over en længere tidsperiode og dels vil være betydeligt fortyndet, anses det for mindre sandsynligt, at der udbringes infektiøse koncentrationer af PRRSV på markerne.

Forsuring af gyllen inden udbringelse kan anvendes til at nedbringe risikoen for smitte. I forbindelse med saneringer for PRRSV er det vigtigt, at alle retningslinjer for håndtering af gylle overholdes.

Referencer

- [1] Torremorell, M. et al. (2004): Evaluation of potential sources of PRRS virus infection in negative herds. Allen D. Leman Swine Conference, Saint Paul, MN. S. 5.
- [2] Goldberg, T.L. et al. (2000): Genetic, geographical and temperal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. *J. Gen. Virol.*, 81, s. 171-179.
- [3] Kristensen, C.S. et al. (2004): Experimental airborne transmission of PRRS virus. *Veterinary Microbiology*, 99, s. 197-202.
- [4] Kvisgaard, L.K. et al. (2020): A recombination between two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) vaccine strains has caused severe outbreaks in Danish pigs. *Transbound Emerg. Dis.*, 67, s. 1786-1796.
- [5] Arruda, A.G. et al. (2019): Aerosol Detection and Transmission of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Whai Is the Evidence, and What Are the Knowledge Gaps? 11,712
- [6] Wills, R.W. et al. (1997) Transmission of PRRSV by direct, close, og indirect contact. *Swine Health and Production*, 5(6), s. 213-218.
- [7] Christianson, T.C. et al. (1993): Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection in Mid-gestation Sows and Fetuses. *Can. J. Vet. Res.*, 57, s. 262-268.
- [8] Plut, J., Jamnikar-Ciglenecki, U. og 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 ad serum. *BMC Veterinary Research* 16:164.
- [9] Toman, M. et al. (2019): Dynamics and Differences in Systemic and Local Immune Responses After Vaccination With Inactivated and Live Commercial Vaccines and Subsequent Subclinical Infection With PRRS Virus. *Front. Immunol.* 10:1689.
- [10] Bloemraad, M. et al. (1994): Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Veterinary Microbiology* 42, s. 361-371.
- [11] Linhares, D.C.L. et al. (2012): Infectivity of PRRS virus in pig manure at different temperatures. *Veterinary Microbiology*, 160, s. 23-28.
- [12] Dee, S.A., Martinez, B.C. og Clanton, C. (2005): Survival and infectivity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine lagoon effluent. *Veterinary Record*, 156, s. 56-57.
- [13] Jacobs, A.C. et al. (2010): Stability og Porcine reproductive and respiratory syndrome virus at ambient temperatures. *J. Vet. Diagn Invest.* 22:257-260.
- [14] Husdyrgødningsbekendtgørelsen - Bekendtgørelse om miljøregulering af dyrehold og om opbevaring og anvendelse af gødning, nr. 1176 af 23/07/2020. <https://www.retsinformation.dk/eli/ta/2020/1176>
- [15] Referenceværdier fra DMI's vejrarkiv (2006-2015). <https://www.dmi.dk/vejrarkiv/>, fra d. 21-01-2021.
- [16] Hermann, J.R. et al. (2005): Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. *Veterinary Microbiology*, 110, s. 7-16.
- [17] Cutler, T. D. et al. (2011): Median infectious dose (ID₅₀) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate MN-184 via aerosol exposure. *Veterinary Microbiology*, 151, s. 229-237.
- [18] Dee, S.A. et al. (2004): An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 68, s. 128-133.

- [19] Kai, P. et al. (2008): A whole-farm assessment of the efficacy of slurry acidification in reducing ammonia emissions. European Journal of Agronomy, 28, s. 148-154.

NAV nr.: 1170

//KMY //

Dyregruppe: Søer, smågrise og slagtesvin
Fagområde: Virus, PRRSV, luftvejsinfektioner
Nøgleord: PRRSV, gylle, fæces, gødning



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.