

Porcint reproduktions- og respirations syndrom virus - dynamik, persistens og genetisk karakterisering i tre danske svinebesætninger efter massevaccination

Kandidatspeciale

Af Sarah Nielsen (Cand.med.vet) og Josefine Meyer Jørgensen (Cand.med.vet)

Vejleder: Lars E. Larsen, professor, MSO, DVM ved DTU VET

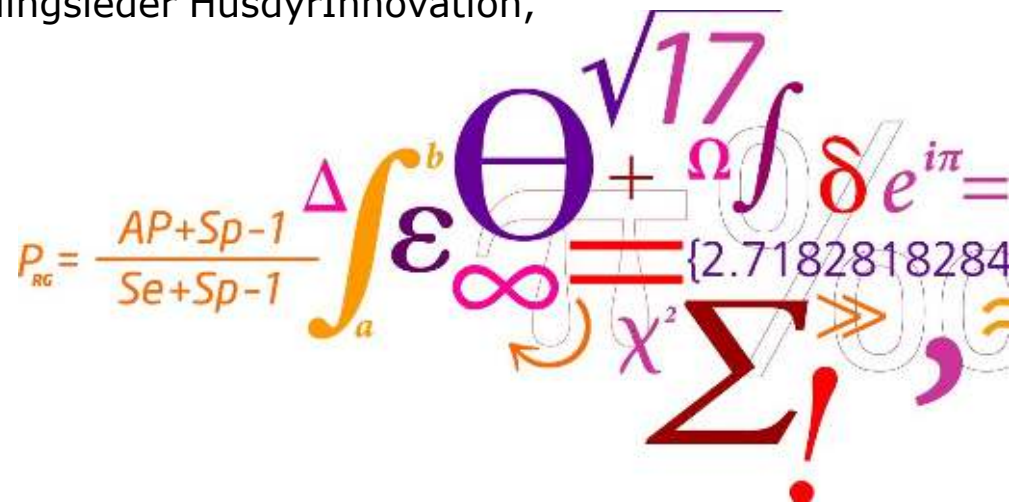
Medvejledere:

Jens Peter Nielsen, professor ved Sektion for Produktion og Sundhed, KU

Lise K. Kvisgaard, post.doc. ved Sektion for Virologi, DTU VET

Charlotte S. Kristensen, DVM, ph.d., afdelingsleder HusdyrInnovation,
Sundhed & Velfærd, svin, SEGES

DVHS: 2. november 2017



Baggrund for projektet

- **PRRS: Økonomisk belastende sygdom hos svin**
 - Besætningen
 - Nationalt
- **Problembesætninger: Umuligt at eliminere PRRSV**
 - Vaccination
 - Management
- **Situationen i blitz vaccinerede/forsøgt sanerede besætninger ikke klarlagt**



http://www.upi.com/Science_News/2015/12/08/Scientists-breed-pigs-resistant-to-incurable-disease/1561449593261/

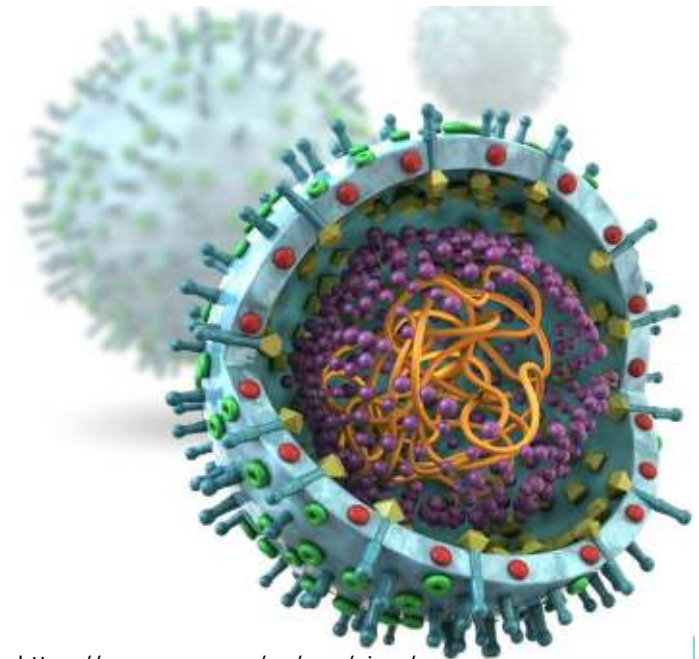
Formål

At undersøge dynamik, persistens og genetisk karakteristika af PRRSV i 3 formodede stabile besætninger

- Undersøge hvorfor PRRSV er til stede
- Hvilke sektioner var positive
- Undersøge forskellige diagnostiske metoder



http://www.porc-ex.dk/K%C3%B8b_Salg.asp



<https://www.prrs.com/en/prrs/virus/>

Studiedesign - Inklusionskriterier

- **Udvælgelse af besætning:**
 - Stabilt sohold
 - Blitz vaccination med Ingelvac PRRS® MLV
 - Implementation af management strategi
 - Problemer med PRRSV i klimastalden
- **På baggrund af dette blev 3 besætninger udvalgt**
 - Idexx ELISA viste PRRSV antistoffer i 30 kgs grise

Studiedesign – Kliniske observationer og spørgeskema

- **Registrering af klinisk symptomer (4, 8, 12 ugers grise)**
 - Utrivelige grise
 - Respirationsproblemer (hoste og nysen)
 - Antal diarre klatter
- **Spørgeskema**
 - Produktionsdata
 - Antibiotikaforbrug
 - Management rutiner (McRebel)



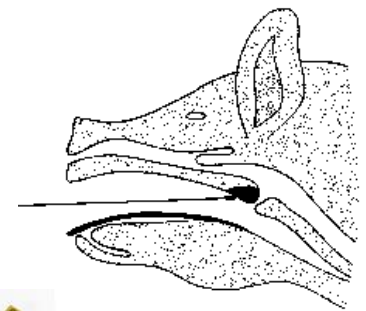
<https://www.colourbox.dk/billede/mand-med-pen-og-spoergeskema-billede-1950144>

Studiedesign – Prøvestørrelse/prøvetype

Formodet prævalens på 0-10% - større prævalens hos ældre grise (12 ugers)
(*Duinhof et al., 2011*)

- **Prøvetype**

- Blodprøver
- Tonsilsvaberprøver
- Placenta navlesnors serum prøver (PUCS)
- Luftprøver (forsøgsbasis)



<http://www.thepigsite.com/pighealth/article/584/swabbing-the-nose-and-tonsils-for-bacteria/>

http://www.bioteknologiradet.no/2012/02/genesting-foreslartretningslinjer/blodprover_scanstockphoto_image_1297329web/

<http://aerocollect.madebydelta.com/aerocollect/apparatet/>

Studiedesign – Antal prøver/ aldersgrupper

	0 uger grise	4 uger grise	8 ugers grise	12 ugers grise
PUCS	12-16 prøver			
Blod serum		60 prøver 6 poolede prøver	30 prøver 6 poolede prøver	30 prøver 6 poolede prøver
Tonsil svaber	30 prøver 6 poolede prøver			30 prøver 6 poolede prøver
Luftprøver		x	x	x

Studiedesign – Udtagnings strategi

- **PUCS:** Landmand opsamlede → på køl (48 timer max)



- **Luftprøver**

- 2 prøvemethoder
 - Taget fra 4, 8 og 12 ugers grise



Resultater og databehandling

- **Spørgeskema** (afvigende fra retningslinjer):
 - Kuldudjævning
 - AI/AU i farestald og klimastald
 - Placering af nyfravænnede i farestald
 - Vask af støvler og hænder
- **Kliniske registreringer**
 - Intet at bemærke (alle < 5%)
- **Produktionstal** (landsgennemsnittet)
 - Besætning 3
 - Dødfødte/kuld ↑
 - Fravænnede/kuld ↓
 - Døde til fravænning ↑

Resultater og Databehandling

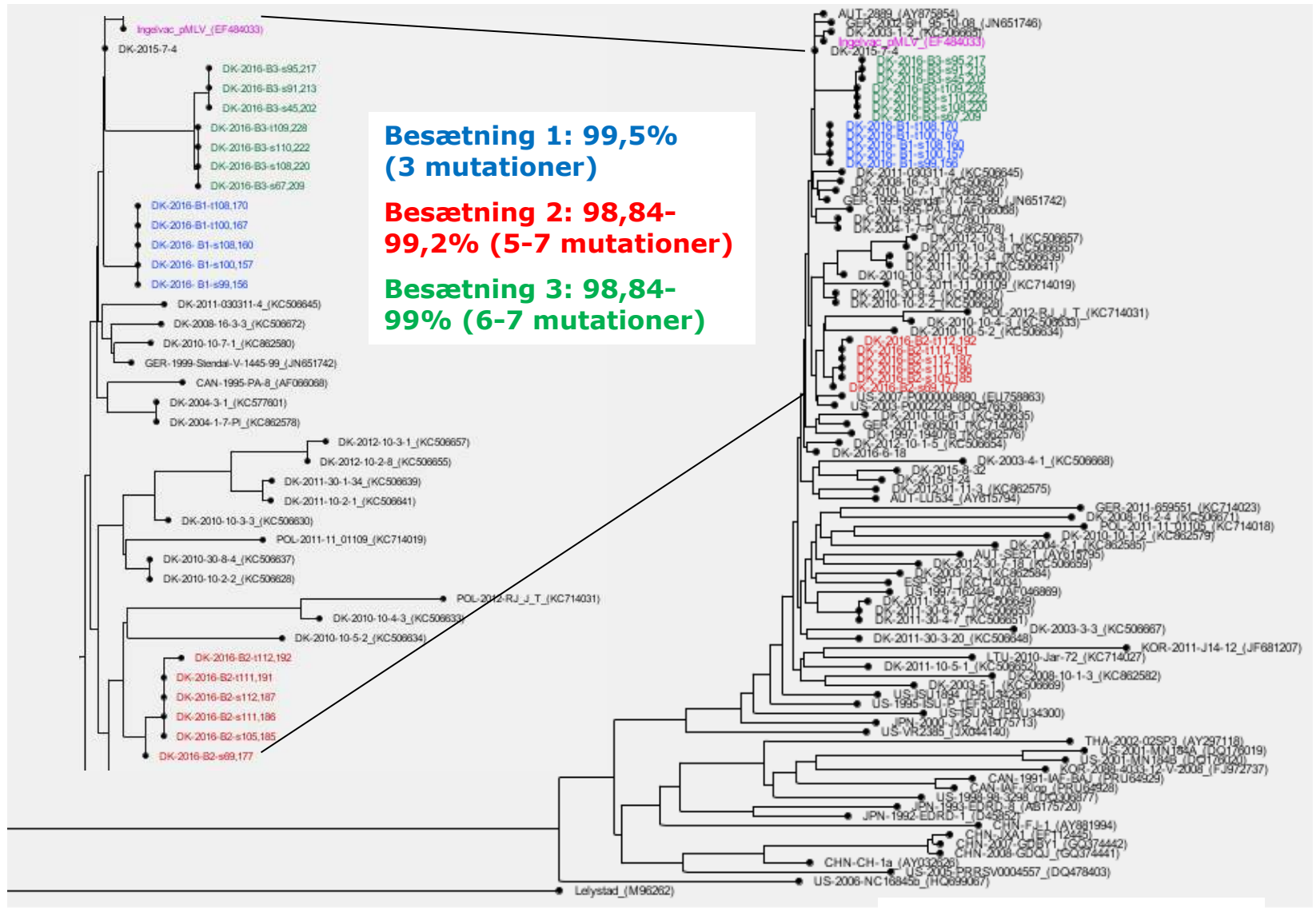
Positive fund af PRRSV

		4 ugers grise	8 ugers grise	12 ugers grise
Blod serum	Besætning 1			5/6 pools <i>gns. Ct-værdi: 30,8</i>
	Besætning 2		4/5 pools <i>gns. Ct-værdi 32,14</i>	6/6 pools <i>gns. Ct-værdi: 32,3</i>
	Besætning 3	3/6 pools <i>gns Ct-værdi: 35,33</i>	2/6 pools <i>gns. Ct-værdi: 34,32</i>	6/6 pools <i>gns. Ct-værdi: 31,7</i>
Tonsil svaber	Besætning 1			5/6 pools <i>gns. Ct-værdi 35,9</i>
	Besætning 2			6/6 pools <i>gns. Ct-værdi: 36,5</i>
	Besætning 3			6/6 pools <i>gns. Ct-værdi: 33,1</i>

Ingen PUCS eller luftprøver var positive

Resultater og Databehandling

Sanger sekventering, ORF5

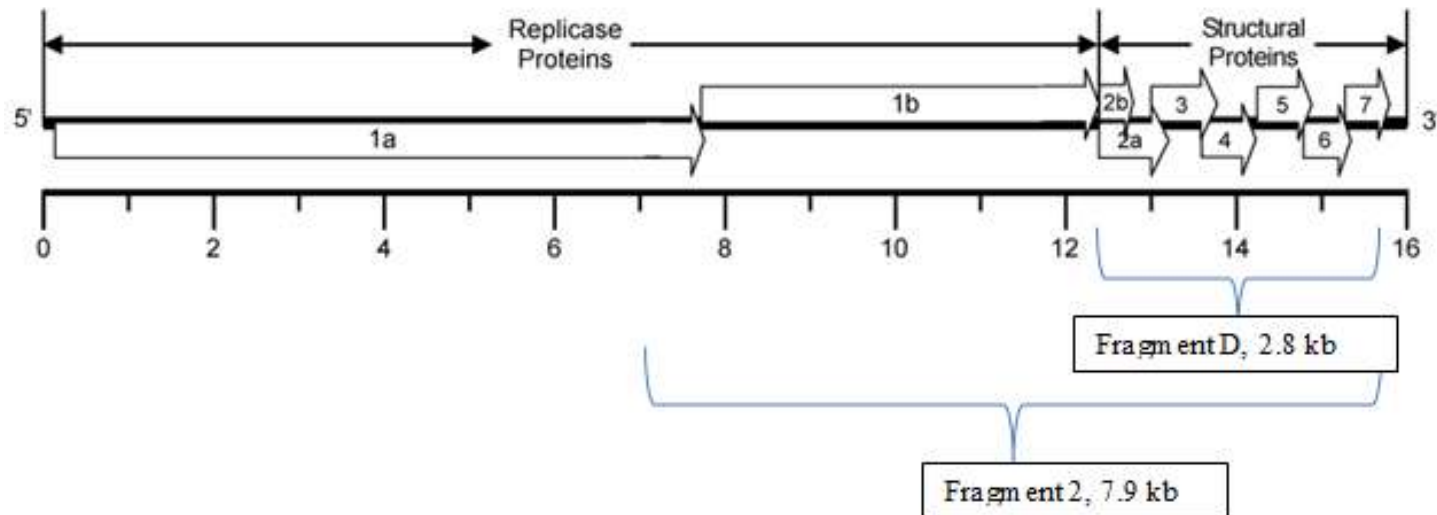


Resultater og Databehandling

Next generation sequencing

NGS, Ion Torrent

- 10 prøver gav brugbare sekvenser (metode 1)
 - Kun fragment 2, fragment D
- Ingen quasispecies blev fundet



moduleret fra: <https://doi.org/10.4167/jbv.2006.36.4.293>

Hypoteser

- **H₀ 1:** Der er ingen signifikant forskel i PRRSV forekomst ved sammenligning af real time RT-PCR resultater fra PUCS og fra tonsil svaber (0 ugers grise).
 - Der findes ingen forskel da alle disse prøver var negative
- **H₀ 2:** Der er ingen signifiant forskel i PRRSV forekomst ved sammenligning af real time RT-PCR resultater fra blod serum og tonsil svaber (12 ugers grise).
 - Ingen forskel. Dog ses signifikant forskel ($p = 0,003$) hvis man sammenligner Ct-værdier (serum lavere end tonsil svab)
- **H₀ 3:** Der er ingen signifikant forskel mellem virus load (Ct-værdier) i forskellige aldersgrupper.
 - Der ses ingen signifikant forskel (p -værdi = fra 0,33 til 0,95)
- **H₀ 4:** Der er ingen signifikant forskel på PRRSV quasispecies og alderen af grisen.
 - Der ses ingen forskel, da der ikke blev fundet nogen quasispecies.
- **H₀ 5:** Der er ingen signifikant forskel på antallet af kliniske syge dyr og PRRSV status i blod serum.
 - Der ses ingen signifikant forskel ($p = 1$).

Diskussion - Resultater

Negative fund ved 0 ugers grise (PUCS, tonsil svaber)

- Sandt negative = stabilt sohold
 - PUCS valideret metode ved PCV2 (*Seate et al., 2016*)
 - Tonsil svaber ikke valideret ved denne aldersgruppe
- Falsk negative
 - Insufficient prøveudtagning/ prøvestørrelse
 - Ingen eller for lav koncentration af PRRSV i tonsilerne

Negative fund ved luftprøver

- Vi ved; Luftbåret transmission af PRRSV
- Ikke sensitiv nok til at detektere?
 - Fortynding af PRRSV i luft
 - Ct-værdier indikere lav-viræmiske grise
 - Prøver ikke oprenset, real time RT-PCR ikke valideret til detektion

Diskussion - Resultater

Besætning 1:

- Positive pools kun ved 12 ugers grise (blod/tonsil)
- Ingen direkte brud på McRebel
 - Ingen vask ad hænder og støvler
 - Intern biosikkerhed: Bevægelse ml. afsnit

Besætning 2:

- Positive pools ved 8 uger (blod) og 12 ugers grise (blod/tonsil)
- McRebel strategi
 - Følger ikke AI/AU
 - Vask ad hænder og støvler ml afdelinger

Diskussion - Resultater

Besætning 3:

- Positive pools ved 4 ugers grise (blod), 8 ugers grise (blod) og 12 ugers grise (blod/tonsil)
 - 4 ugers: Litteratur (*Yoon et al., 1993*) viræmi 3 dage PI
 - Smittet i farestald:
 - 2 scenarier
 - Ikke stabilt sohold
 - Cirkulerende smitte
 - Intern biosikkerhed
 - Fravænningsgrise i farestalden (*Murtaugh et al., 2010; Morrison et al., 1996*)
 - Smittet i klimastand:
 - Som besætning 2

Diskussion - Resultater

Kliniske symptomer på PRRSV

- Generelt lav prævalens af kliniske symptomer
- Sammenhæng mellem PRRSV i blod og prævalens af klinisk syge grise:
 - Problematikker ved observationer
 - På tværs af aldersgrupper/besætninger
 - Syntetisk cut-of værdi
 - Vaccinerede besætninger

Diskussion - Resultater

Sanger sekventering ORF5

- Stor lighed med Ingelvac PRRS® MLV
- Lille intraherd variation (cluster)
- En smule interherd variation
 - Diagnostisk perspektiv

Next generation sequencing, Ion Torrent

- Ikke fuldgenom sekventering
 - For lille koncentration af PRRSV
 - Dårlig kvalitet RNA
 - Primer bindingssted
- Ingen quasispecies
 - Stikprøve størrelse og fordeling
 - Vaccine strain

Diskussion - anbefalinger

Besætning 1+2 (klimastald)

- Skubbe virus ud
 - AI/AU strikt
 - Fokus på intern biosikkerhed
 - Hygiejne
- Sanering af klimastald (depopulering)

• Besætning 3 (farestald/klimastald?)

- Er søer stabile?
 - Blodprøver af søer (real time RT-PCR)
 - Nej: Blitz vaccinerings
 - Ja: Kontamination af farestald
 - Kuldudjævning (før 24 timer)
 - Flyt nyfravænnede
 - Klimastaldsproblem
 - Samme anbefalinger som ved de andre besætninger

Validering af resultat/fejlkilder

Spørgeskema

- Subjektive svar
- Ikke bekræftet gennem kontrolbesøg

Fejlkilder i forbindelse med håndtering af prøver

- Hygiejne
- Udtagning
- Transport
- Nedfrysning/optøning



http://www.condenaststore.com/-sp/There-s-a-flaw-in-your-experimental-design-All-the-mice-are-scorpios-Cartoon-Prints_i8641553_.htm

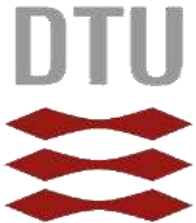
Konklusion

- PRRSV var tilstede i alle 3 besætninger
- Ingen besætninger fulgte McRebel fuldstændig
- Kun besætning 3 viste tegn på PRRSV i produktionsdata
- Lav prævalens af kliniske symptomer
- Negative PUCS og tonsil svaber ved 0 ugers grise = stabilt sohold
- Negative luftprøver
 - Præcis metode?
- Detektionsmetode: Serum bedre end tonsil svaber
- Sanger sekventering af ORF5 → høj lighed med Ingelvac PRRS®MLV
 - Lav intraherd variation
 - Lille interherd variation
- Next generation sequencing:
 - Ingen quasispecies
 - ORF5 identisk med Sangers ORF5

Stor tak til !

Lars E. Larsen, Lise K. Kvisgaard, Jens Peter Nielsen, Charlotte S. Kristensen, Jakob Bagger, Anders Elvstrøm, Hue Thi Thanh Tran, Susanne Dahl Kjærgaard, Lotte Skade, Marlene Danner Dalgaard, besætningsejere, Alexandar Dukanovic.

Specialeprojektet er sponsoreret af



Danmarks
Tekniske
Universitet



Boehringer
Ingelheim

