

Luftbåren transmission af Porcint reproduktions- og respirationssyndrom virus



Veterinært speciale af Anne Priebe Schmidt

Betydning af PRRS for den danske svineproduktion

- Økonomisk (Kristensen *et al.* 2013)
 - 112 mio. kr. årligt
 - Tabt sundhedstillæg
 - Øget dødelighed
 - Nedsat tilvækst
- Velfærdsmæssigt
 - Højere dødelighed
 - Sekundære infektioner
 - Flere dødfødte
 - Højere antal aborter

- Information om luftbåren transmission er vigtigt til at kontrollere PRRSV
- Metoder til at påvise PRRSV i luften kan være effektivt til kontrollen af PRRSV

Formål

- *Pilot studie:*
 - Undersøge om PRRSV kunne påvises i luften uden for en PRRSV-positiv besætning
- *Felt studie 1:*
 - Undersøge afstanden hvorpå PRRSV kunne påvises uden for en PRRSV-positiv besætning sammenholdt med meteorologiske risikofaktorer
- *Felt studie 2:*
 - Undersøge om PRRSV kunne påvises inde i en PRRSV-positiv besætning i et større studie og sammenligne resultaterne med fund i blodprøver

Pilot studie

- Validering af om PRRSV kunne påvises i luften uden for en PRRSV-positiv besætning
- Validering af vejrstation
- Periode: 10 december 2013 – 10 januar 2014
- Hjælp af Svinevet til at udpege PRRSV-positive besætninger med aktiv virusudskillelse (høje titerværdier i IPT)

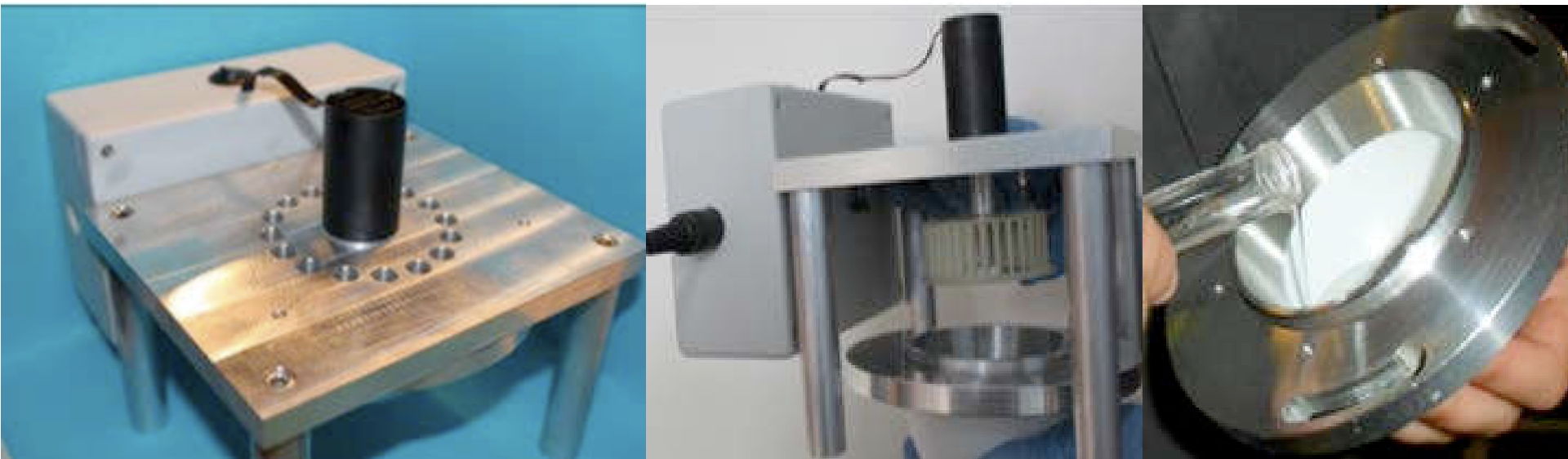
Besætninger

	Besætning 1	Besætning 2	Besætning 3, site 1	Besætning 3, site 2
Besætnings- størrelse	1200 klimagrise 600 slagtesvin	2000 slagtesvin	1100 slagtesvin	4800 klimagrise 1500 slagtesvin 200 polte
SPF-status	SPF+Myc+DK	Ukendt	SPF+Myc+AP6+ AP12+DK+ Vac	SPF+Myc+AP6+ AP12+DK+ Vac
Polte	I.o.	I.o.	Egen produktion Karantæne inde i Besætning 3, site 2	Egen produktion Karantæne inde i Besætning 3, site 2
Vaccination			Ingelvac [®] PRRS MLV	Ingelvac [®] PRRS MLV
Blodprøver positiv for PRRS i IPT	23 Sep. 2013, Type 1	6 Dec. 2013, Type 1+2	5 Dec. 2013 Type 2	5 Dec. 2013 Type 2

I.o.: Ikke oplyst

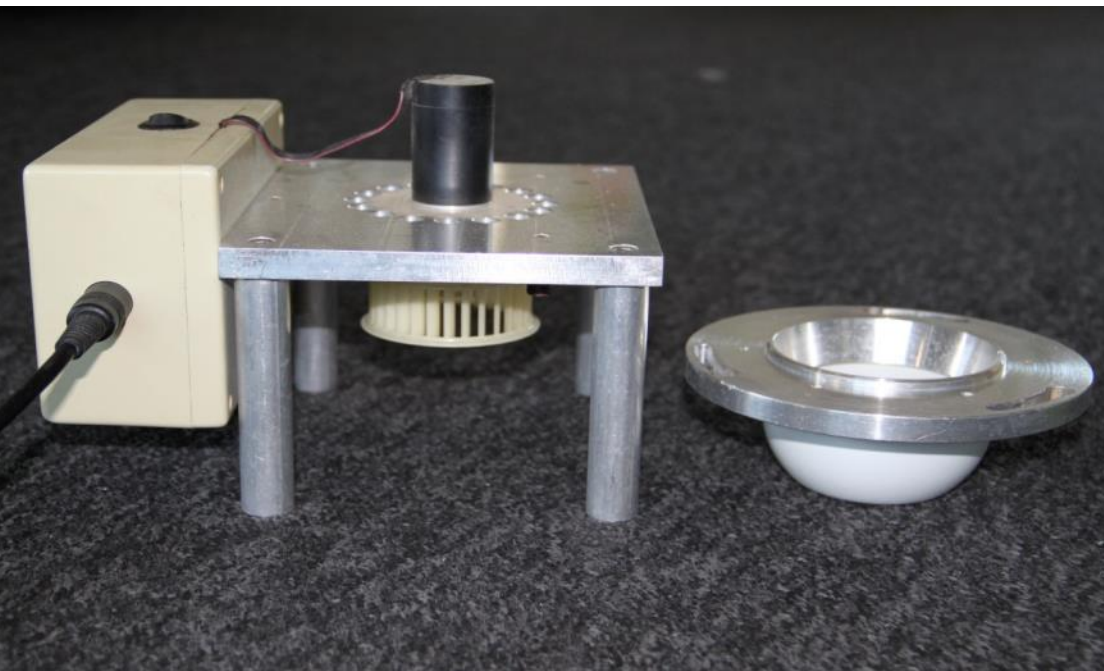
Cyklonen

- Opsamlede 400 L luft/min
- Luften blev centrifugeret i opsamlings-skålen, hvor der var tilsat 10 mL PBS (Phosphate buffered saline)
- Væsken blev taget op med en pipette
- Blev fyldt op i 15 mL rør



Opsamling af luftprøver

- Cyklon 30 meter fra besætningen i vindretningen
- Opsamlede luft i 2 x 30 minutter
- I alt 20 prøver



Vejrmålinger

- Vejr måler opstillet i en radius af op til 5 meter fra cyklonen
- Opsamler data med 5 minutters interval i hele opsamlingsperioden.
 - Temperatur ($^{\circ}$ C)
 - Luftfugtighed (%)
 - Lufttryk (hPa)
 - Vindhastighed (m/s)
 - Vindstødshastighed (m/s)
- Gennemsnit beregnet



Opbevarelse/forsendelse/rengøring

- Prøver opbevaret i køleboks
- Opbevaret i køleskab i max. 9 dage (Kvisgaard 2014)
- Afsendt i ESP blodprøvekasse med køleelement/isterningpose
- Imellem hver dag blev cyklonen rengjort grundigt med Virkon S



Resultater, RT-PCR

	Prøve nr.	Ct-værdi/Genotype	Antal dage i køleskabet
Besætning 1	1	Negativ	Sendt samme dag
	2	Ct: 38,79; type 1	Sendt samme dag
	3	Ct: 35,01; type 1	6
	4	Negativ	6
Besætning 2	5	Negativ	1
	6	Negativ	1
	7	Ct: 37,25; type 1	Sendt samme dag
	8	Negativ	Sendt samme dag
Besætning 3, site 1	13-14	Negativ	Sendt samme dag
	15-16	Negativ	9
	17-18	Negativ	8
Besætning 3, site 2	9-10	Negativ	5
	11	Negativ	4
	12	Ct: 38,8; type 1	4
	19-20	Negativ	3

Resultater, vejrdata

	PRRSV-positive	PRRSV-negative	p-værdi
	vejr dage	vejr dage	
Temperatur (° C)	6,3 – 8,3	5,7 – 6,9	0,25
Luftfugtighed (%)	83 – 93	84 – 90	0,20
Luftryk (hPa)	983,1 – 1017	978,1 – 999,8	0,15
Vindhastighed (m/s)	0,6 – 2,5	1,0 – 4,4	0,07
Vindstødshastighed (m/s)	1,0 – 3,0	1,3 – 5,5	0,07

Sammenligning af PRRSV-positive vejrdage med forsøg af Dee *et al.* (2010)

	PRRSV-positive vejrdage	Dee <i>et al.</i> (2010)
Temperatur (° C)	6,3 – 8,3	-2,6 – 4,8
Luftfugtighed (%)	83 – 93	77 – 82
Luftryk (hPa)	983,1 – 1017	979 – 984
Vindhastighed (m/s)	0,6 – 2,5	1,4 – 1,9
Vindstødshastighed (m/s)	1,0 – 3,0	2,8 – 3,7

Felt studie 1

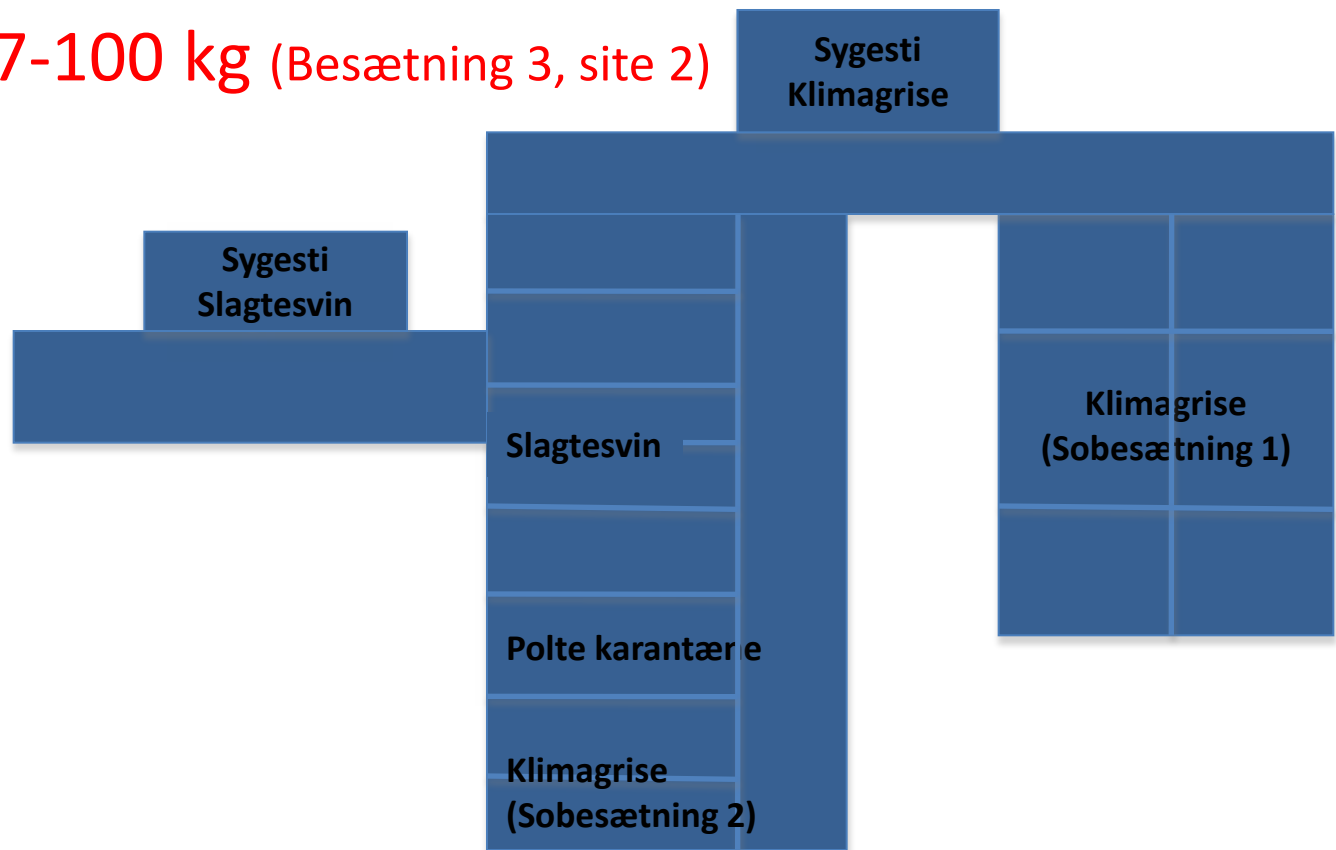
- Undersøge om PRRSV kunne påvises i luften i op til 3 km fra en PRRSV-positiv besætning i et større studie sammenholdt med meteorologiske risikofaktorer
- Periode: 14 januar – 26 februar 2014

Valg af besætning

- Besætning 3, site 2
 - PRRSV type 1 blev fundet i luftprøver udenfor i Pilot studiet
 - Overvejende antistoffer mod PRRSV type 2 i IPT men også lave titerværdier mod PRRSV type 1
- Håbde at begge type kunne fanges i luften udenfor besætningen

Besætning 3

- Multisite, 6 sites:
 - To so-ejendomme
 - Tre slagtesvinsbesætninger
 - En fra 7-100 kg (Besætning 3, site 2)



Indsamling af luftprøver

Besætning 3, site 2

- 2 uger, 30 meter fra besætningen
 - 2 uger, 1 km fra besætningen
 - 2 uger, 3 km fra besætningen
- I alt 60 luftprøver!



Vejrmålinger

- Samme parametre som Pilot studiet



Problemer undervejs

- 30 meter:
 - PBS frøs til is (4/20 prøver) pga. blæst og chilfaktor på -14° C
 - Undersøgte hvor hurtigt det skete – 4 min!
 - Cyklon på bagsædet af bilen (4/20 prøver; også i 6/20 prøver ved 1 km)



Resultat af luftprøver

- Analyseret på DTU-vet via RT-PCR



- ALLE 60 luftprøver negative for PRRSV!

Resultater, vejrdata

	PRRSV-neg. vejr dage 30 meter	PRRSV-neg. vejr dage 1 km	PRRSV-neg. vejr dage 3 km	PRRSV-pos. vejr dage <i>Pilot studie</i>	p-værdi ^a
Temperatur (° C)	-6.5 – 4.8	1.2 – 8.8	1.2 – 8.8	6,3 – 8,3	0.005
Luftfugtighed (%)	76 – 93	80 – 95	80 – 95	83 – 93	0.19
Luftryk (hPa)	992.2 – 1013.3	975.9 – 1002	975.9 – 1002	983,1 – 1017	0.88
Vindhastighed (m/s)	1.0 – 6.6	2.0 – 5.5	2.0 – 5.5	0,6 – 2,5	0.007
Vindstødshastighed (m/s)	1.0 – 7.0	2.5 – 6.6	2.5 – 6.6	1,0 – 3,0	0.02
Kommentarer	Chill factor ned til -14.4 ° C 4/20 prøver frosne 4/20 prøver på bagsædet	Chill factor ned til - 11.7° C 6/20 prøver på bagsædet			

^aSammenligning af PRRSV-negative vejr dage opsamlet 30 meter fra besætningen med PRRSV-positive dage i Pilot studiet

Blodprøver

- 60 blodprøver udtaget:

	IDEXX ELISA	RT-PCR
5 uger (fravænnnet 9 dg forinden)	0/20	0/4
10 uger	20/20 (type 2)	4/4 (type 2) (høje mængder $\approx 10^6$ /ml)
16 uger Analyseret på bioScreen	20/20 (type 2)	1/4 (type 2) (høj mængde $\approx 10^6$ /ml)

Rebprøver

- 12 rebprøver indsamlet:

	IDEXX ELISA	RT-PCR
5 uger (fravænnnet 9 dg forinden)	0/4	0/4
10 uger	4/4 (type 2)	0/4
16 uger	4/4 (type 2)	0/4

Analyseret på bioScreen

- Dvs. blod- og rebprøver stemte ikke overens mht. påvisning af virus!

Luftprøver, indenfor

- 4 luftprøver opsamlet:

	Ct-værdi/genotype
5 uger (fravænet 9 dg forinden)	38,38 (type 2)
10 uger	35,8 (type 2)
Sygesti, klimastald	35,5 (type 2)
16 uger	36,6 (type 2)

- Alle høje Ct-værdier – dvs. lave mængder af virus!

- Dvs. fravænnede på daværende tidspunkt PRRSV-negative grise og grisene blev smittet i klimastalden
- Vi påviste endda PRRSV i luften hos de nyfravænnede grise inden antistoffer/virus kunne påvises i blodet via RT-PCR eller ELISA!

Sekventering

			Amvervac	6,10	20,80	6,70	***	62,10	63,90	63,90	63,20	63,00	63,40	61,40
			1-8-8	54,50	57,00	53,20	53,70	***	85,40	85,70	84,90	84,60	85,40	83,70
			IngelvacPRRSMLV	50,80	54,20	48,60	49,90	16,70	***	99,00	98,70	98,50	98,30	95,00
EndNur	Serum	NA-MLV	DK155	50,40	54,50	48,20	49,90	16,20	1,00	***	98,70	98,30	99,00	94,70
EndNur	Serum	NA-MLV	DK156	51,00	54,40	48,90	51,40	17,30	1,30	1,30	***	99,70	98,30	94,70
EndNur	Serum	NA-MLV	DK157	51,40	54,80	49,20	51,70	17,80	1,50	1,70	0,30	***	98,00	94,70
EndNur	Serum	NA-MLV	DK158	50,70	53,40	48,50	51,00	16,70	1,70	1,00	1,70	2,00	***	94,70
MidFin	Serum	NA-WT	DK159	54,50	55,60	52,40	55,50	19,00	5,20	5,60	5,60	5,60	5,60	***

- 4 poolede blodprøver fra slutningen af klimastalden:
 - Høj genetisk lighed med vaccinstammen (98,3 – 99%)
- 1 poolede blodprøve fra slagtesvin:
 - Vildtype (94,8 % genetisk lighed med vaccinstammen)

Hvorfor fandt vi ikke PRRSV i luftprøverne udenfor?

- Frossen PBS
- Opbevaret for længe i køleskab (trods Kvisgaard 2014's holdbarhedsstudie samt fundet PRRSV i Pilot studie ved 6 dage i køleskab)
- Forsendelse

Hvorfor fandt vi ikke PRRSV i luftprøverne udenfor (fortsat)?

- Cyklon på bagsædet af bilen (*Otake et al., 2010*)
- Signifikant højere vind- og vindstødshastighed sammenlignet med PRRSV-positive vejrdage i Pilot studiet ($p=0,007$; $p=0,02$)

Hvorfor fandt vi ikke PRRSV i luftprøverne udenfor (fortsat)?

- Lav virusload i luften
- RT-PCR assay ikke sensitiv nok

Felt studie 2

- PRRSV kunne ikke påvises i luften uden for en PRRSV-positiv besætning i et større studie
- Undersøge om PRRSV kunne påvises i luften inden i en PRRSV-positiv besætning i et større studie og sammenligne resultaterne med fund i blodprøver

Valg af besætning

- Klinik hos søerne i Sobesætning 1 – akut udbrud
 - Kristian Havn beslutter d. 27/4-14 at blitze alle søer, gylte, orner og smågrise op til 30 kg
 - Grisene vaccineres ved fravænning frem til midten af august
- Besætning 3, site 2
- Periode: 7 maj 2014 – 10 juli 2014

- Alle grise der blev indsat i Besætning 3, site 2 var vaccineret
- Fravænnede grise fra både Sobesætning 1 (akut smittet) og Sobesætning 2 (fri for PRRSV)

Luftprøver

- Luftprøver blev taget én gang i ugen i 9 uger
- Cyklonen blev placeret i midten af rummet ca. 50 cm over gulvet



Tre grupper grise blev fulgt

- *Gruppe 1*: 14 ugers grise, der ikke var vaccinerede
 - *Gruppe 2*: 13 ugers grise, der var vaccineret ca. 11 uger gamle (formentlig vaccineret efter de var smittet)
 - *Gruppe 3*: Grise i slutningen af klimastalden (ca. 10 uger) der var vaccineret ca. 1-9 uger gamle (formentlig født viræmiske, smittet i farestalden eller i klimastalden)
-
- Ca. 300 grise i hver stald
 - Imellem prøverne blev cyklonen skyllet for at forhindre falsk positive resultater

Blodprøver

- 5 blodprøver blev taget i hvert af de tre afsnit for at følge mængden af virus i grisene sammenholdt med luftprøverne
- Blodprøverne blev poolet i prøver af fem

RT-PCR resultater

Gruppe 1 og Gruppe 2

	Samples	7/5-14	15/5-14	22/5-14	2/6-14	10/6-14	17/6-14	26/6-14	3/7-14	10/7-14
Group 1	Air	Start	Ct: 29.54	Ct: 31.95				End (slaughtered)		
	Blood	Not taken	Start			C: 37.27		End (slaughtered)		
Group 2	Air		Start	Ct: 31.76	Ct: 34.21					End (slaughtered)
	Blood		Start	Ct: 35.69						End (slaughtered)

Green: Air sample collected this day was PRRSV real-time RT-PCR positive (type 2)

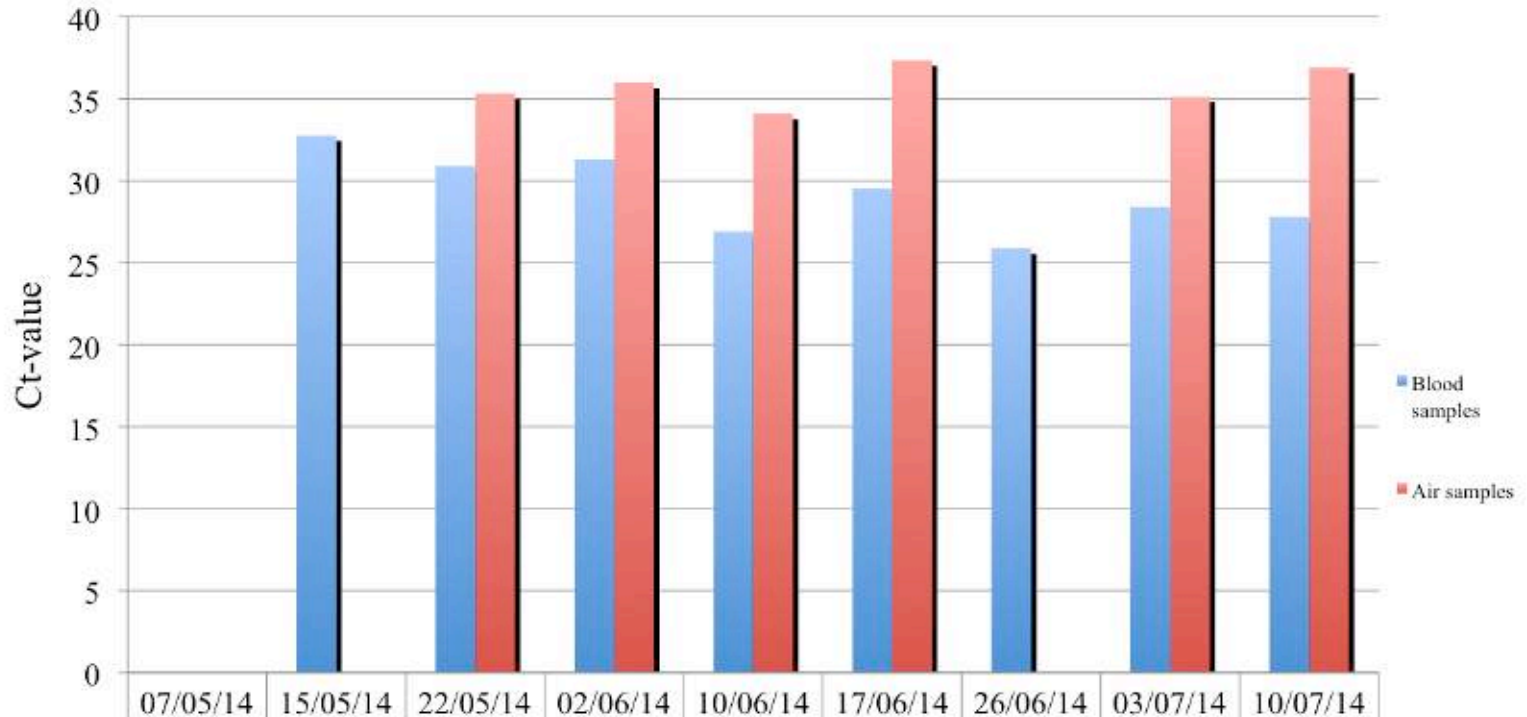
Red: Air sample collected this day was PRRSV real-time RT-PCR negative

Start/end: The period where the groups were followed

- Lav frekvens i begge grupper
 - Gr. 1: Luftprøver: 2/7; blodprøver: 1/6
 - Gr. 2: Luftprøver: 2/8; blodprøver: 1/8
- Infektion ikke igangværende i hele forsøgsperioden
 - Ingen sammenblanding
 - Ikke undersøgt i klimastalden
- Dobbelt så mange positive luftprøver som blodprøver

RT-PCR resultater

Gruppe 3



- PRRSV fundet i næsten alle prøver taget (luftprøver:6/9 og blodprøver: 8/8)
 - Flere stalde sammenblandet (også grise fra de to sobesætninger)
 - Smittet under akut udbrud (født viræmiske, smittet som smågrise)
- Signifikant højere Ct-værdier (lavere mængde virus) i luftprøverne end i blodprøverne ($p=0,003$)
 - Formentlig pga. fortyndingseffekten

Sekventering af luft- og blodprøver

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ingelvac-EF484033_ORF5	1	7	7	6	5	4	6	1	9
Finisher pigs, non-vaccinated (Gr. 1), air, 15/5-14	2	98,84	14	13	12	11	13	8	16
Pigs end nursery (Gr. 3), blood, 10/6-14	3	98,84	97,68	5	2	3	3	8	12
Pigs end nursery (Gr. 3), blood, 17/6-14	4	99,00	97,84	99,17	3	2	4	7	9
Pigs end nursery (Gr. 3), blood, 26/6-14	5	99,17	98,01	99,67	99,50	1	1	6	10
Pigs end nursery (Gr. 3), blood, 3/7-14	6	99,34	98,18	99,50	99,67	99,83	2	5	9
Pigs end nursery (Gr. 3), blood, 3/7-14	7	99,00	97,84	99,50	99,34	99,83	99,67	7	11
Pigs end nursery (Gr. 3), blood, 10/7-14	8	99,83	98,67	98,67	98,84	99,00	99,17	98,84	10
Pigs end nursery (Gr. 3), blood, 10/7-14	9	98,51	97,35	98,01	98,51	98,34	98,51	98,18	98,34

- Alle 8 luft- og blodprøver viste høj genetisk lighed med vaccinstammen (98,51 – 99,83%)

Hvor stammede de sekventerede virus fra?

- Fra vaccinationen den 27/4-2014?



- Fra et isolat, der stammede fra vaccine-virus?

- Virus viste høj genetisk lighed med vaccinstammen (98,51 – 99,83%)
- Men det viste de sekventerede prøver fra Felt studie 1 også (98,3-99%) og disse grise var ikke vaccineret
- Virus sekventeret fra Gr. 1 viste også høj genetisk lighed med vaccinen (98,84%) og grisene var heller ikke vaccinerede

- Nogle af grisene undersøgt 5-9 uger post vaccination
- Studie viser udskillelse af vaccine i luften kun 13 dage post vaccination (Yeske *et al.* 2012)
- Studie viser at ved vaccination post infektion er det vild-typen, der dominerer i både luft-, blod og tonsil skrab prøver (Linhares *et al.* 2012)

Sammenligning af luft- og blodprøver

	Luftprøver, positiv	Luftprøver, negativ	Total
Blodprøver, positiv	7	3	10
Blodprøver, negativ	3	9	12
Total	10	12	22

- Ingen signifikant forskel på luft- og blodprøver i at påvise PRRSV ($p=0,683$)
- **Cyklon derfor effektivt redskab til at påvise PRRSV i en besætning**

Hvorfra stammede PRRSV type 1 fundet udenfor Besætning 3, site 2 i Pilot studiet?

- Én anden positiv besætning men type 2
- Sobesætning 1 (afstand: 800 m)
- To besætninger med ukendt status

Konklusion

- PRRSV type 1 blev påvist i luften 30 meter fra tre PRRSV-positive besætninger
 - Første gang PRRSV er påvist i luften i Danmark/Europa
 - Første gang PRRSV type 1 er påvist i luften
 - Luftbåren transmission af PRRSV bør formentlig betragtes som en risiko i Danmark

Konklusion (fortsat)

- Signifikant højere vind- og vindstødshastighed blev fundet i PRRSV-negative vejr dage sammenlignet med PRRSV-positive vejr dage ($p=0,07$; $p=0,02$)
- PRRSV type 2 kunne påvises i luften inden i en PRRSV-positiv besætning
- PRRSV blev påvist i luften hos nyfravænnede grise, der var PRRSV-negativ i både RT-PCR og ELISA

Konklusion (fortsat)

- Signifikant højere Ct-værdier blev fundet i luftprøver sammenlignet med blodprøver ($p=0,003$)
- Cyklonen var en effektiv metode til at påvise PRRSV i en PRRSV-positiv besætning sammenlignet med blodprøver
 - Ingen signifikant forskel blev fundet mellem de to metoder ($p=0,683$)

Perspektivering

- Monitorering af PRRSV i en besætning
- Kan anvende cyklonen i karantænestalden inden poltene frigives
- Bedre dyrevelfærd/tidsbesparende ved anvendelse af cyklonen sammenlignet med blodprøver
- Reb kan give falsk negative resultater

Stor TAK til...

- DTU Veterinærinstituttet
 - Lars E. Larsen
 - Lise K. Kvisgaard
 - Charlotte K. Hjulsager
 - Hue Thi Thanh Tran
- Boehringer Ingelheim
 - P. H. Rathkjen
- Margit Andreassen, Veterinærmedicinsk Industriforening
- Svinevet
- Besætningsejere

Tak for opmærksomheden!

