

TONSILLER POSITIVE FOR PRRS-VIRUS I MÅNEDER EFTER PRRS-VACCINATION

Charlotte Sonne Kristensen^a, Lise Kvisgaard^b, Lotte Skade^a, Lars Erik Larsen^b

^aSEGES Svineproduktion, ^bKøbenhavns Universitet

STØTTET AF

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

På trods af, at kun få unge orner var PRRS-virus positive i spyt- og blodprøver, kunne der påvises PRRS-virus i tonsillerne i 23 ud af 23 orner 14-18 uger efter vaccination. Blodprøver fra ældre orner på en PRRS-seropositiv ornestation med salgsstop viste, at 20 % af 287 orner ikke havde målbare PRRS-antistoffer i blodet. Ud af 63 slagtede ældre orner havde tre PRRS-virus positive tonsiller på trods af, at de var PRRS-virus negative i blod. Ved at sammenholde resultatet fra sekventering af PRRS-virus og kendskab til forløbet på hhv. Bøgildgård og ornestationen, er det mest sandsynligt, at der var tale om to forskellige forløb. Det PRRS-virus, som blev isoleret fra Bøgildgårdornerne, stammer fra PRRS-vaccinationen af ornerne, og det PRRS-virus, som blev isoleret fra ornestationen, stammer fra en introduktion af et PRRS-virus til ornestationen.

Sammendrag

Der kunne påvises PRRS-virus i tonsillerne i 23 ud af 23 yngre orner 14-18 uger efter PRRS-vaccination. Hos ældre orner var det langt færre, der var positive for PRRS-virus i tonsillerne. Ud af 63 ældre orner, som var PRRS-virus negative i blod, kunne der påvise PRRS-virus i tonsillerne fra tre orner.

Materialet stammer fra unge orner på Bøgildgård og ældre orner på en PRRS-seropositiv ornestation. De unge orner var vaccineret mod PRRS ved en alder på 4-5 uger. De ældre orner på ornestationen var enten vaccineret ved 4-5 ugers alderen (hvis de var ankommet via karantæne fra Bøgildgård) eller ved 5-5,5 måneders alderen (hvis de var ankommet via karantæne fra en avlsbesætning). På Bøgildgård blev der ved første prøveudtagning udtaget spytprøver fra 40 stier. Ugen efter blev der udtaget nye spytprøver samt blodprøver fra alle orner i PRRS-virus positive stier ved første prøvetagning, og fra så mange orner som muligt fra de stier, blev der udtaget tonsiller ved slagtning. Fra de ældre orner på ornestationen var der udtaget blodprøver fra samtlige orner. Der blev udtaget tonsiller ved slagtning af en del af ornerne.

Alle spytprøver, blodprøver og tonsiller blev undersøgt for PRRS-virus. Blodprøver fra ældre orner blev ligeledes undersøgt for antistoffer mod PRRS-virus.

På trods af, at få unge orner var PRRS-virus positive i spyt- og blodprøver, kunne der påvises PRRS-virus i tonsillerne i 23 ud af 23 orner 14-18 uger efter vaccination. Blodprøver fra ældre orner på en PRRS-seropositiv ornestation med salgsstop viste, at 20 % af 287 orner ikke havde målbare PRRS-antistoffer i blodet. Ud af 63 slagtede ældre orner havde tre PRRS-virus positive tonsiller på trods af, at de var PRRS-virus negative i blod.

Ved at sammenholde data fra sekventering af PRRS-virus med de epidemiologiske data og kendskab til forløbet i de to besætninger er det mest sandsynligt, at PRRS-virus fra Bøgildgårdornerne var PRRS-vaccinevirus og PRRS-virus fra ornestationen var et "Porcilis PRRSV-lignende" feltvirus, der var blevet introduceret i ornestationen udefra.

Baggrund

Porcin reproduktions- og respiratorisk syndrom (PRRS) er en smitsom sygdom, der skyldes PRRS-virus, som findes i to typer: PRRS-virus type 1 og PRRS-virus type 2 [1]. Når grise smittes med PRRS-virus opstår der viræmi, som betyder, at PRRS-virus cirkulerer i blodbanen.

Spredning med PRRS-virus sker til alle væv, når PRRS-virus transporteres med blodet rundt i hele grisens krop. PRRS-virus spredes også til makrofager [2], der primært findes i lunger, milt, lymfeknuder og tonsiller (mandler).

Efter smitte med PRRS-virus er der en inkubationsperiode på 1-4 dage og grisene kan derefter være viræmiske i 4-6 uger [3]. Efter vaccination mod PRRS-virus med en modificeret levende vaccine (MLV) kan der påvises viræmi i op til 62 dage, men hovedparten af grisene vil kun være viræmiske de første 3-4 uger efter vaccination [4]. I løbet af den viræmiske periode kan grisen også udskille PRRS-virus via sekreter (spyt, urin, sæd, gødning) [3,5]. Ældre dyr, som orner, kan dog have et forløb, der er kortere end dette [6,7]. Antistoffer dannes først 10-14 dage efter infektion med PRRS-virus og kan påvises i op til 4-8 måneder [8]. Når en gris har antistoffer mod PRRS-virus kaldes den også PRRS-seropositiv. En skitse over forløbet fra en gris smittes med PRRS-virus til, hvornår virus og antistoffer kan påvises, er vist i figur 1.



Figur 1. Generelt forløb fra grisen smittes med PRRS-virus, hvornår den er viræmisk og hvor længe der kan måles antistoffer.

At grisene ikke længere havde PRRS-virus i blodet 28 dage efter infektion, men stadig havde PRRS-virus i tonsillerne 84 dage efter infektion [4], kan være en udfordring, da grisen kan erklæres fri for PRRS-virus i blod, men fortsat have PRRS-virus i tonsillerne. Dette PRRS-virus i tonsillerne kan måske frigives, hvis grisen producerer ekstra meget spyt ved stress eller opstemthed.

Formålet med dette studie var at undersøge, hvor længe efter vaccination, der kunne påvises PRRS-virus i blod, spyt og tonsiller, samt hvor længe der kunne påvises antistoffer efter vaccination ved multiplex-analyse.

Materialer og metoder

Materialet til denne meddelelse stammer fra to forskellige grupper af orner, hhv. unge testorner på Bøgildgård og ældre orner på en PRRS-seropositiv ornestation.

Bøgildgård

Bøgildgård, SEGES Svineproduktions afprøvningsstation til individafprøvning af orner, blev i sommeren 2020 saneret for PRRS-virus. Ornerne, som indgår i denne meddelelse, ankom til Bøgildgård før saneringen blev opstartet. De var indsat fra PRRS-negative avlsbesætninger og blev vaccineret mod PRRS type 1 (Porcilis PRRS) og type 2 (Ingelvac PRRS@MLV) ved ankomst, hvor de var ca. 4 uger gamle. Driften på Bøgildgård er sektioneret, klimastald (7-30 kg) og afprøvningsstald (30-100 kg) er to separate bygninger.

Saneringen blev gennemført som en delsanering, hvor der blev lavet et stop for indtag af kommende orner på 6 uger samtidig med, at PRRS-vaccinationen blev suspenderet. Da de første PRRS-negative orner skulle flyttes til afprøvningsstalden, var der stadig ældre PRRS-vaccinerede orner i stalden. I alt var der PRRS-vaccinerede orner i seks sektioner fordelt på 40 stier, med 1-9 stier pr. sektion. I hver sti gik der ca. 14 orner.

Første prøveudtagning.

Før overflytning af de PRRS-virus negative orner blev der taget spytprøver fra alle stier i de seks sektioner med PRRS-vaccinerede orner.

Anden prøveudtagning

I stier, hvor der ved første prøveudtagning var påvist PRRS-virus i spytprøverne, blev der udtaget nye spytprøver samt blodprøver fra alle orner.

Tredje prøveudtagning

En del af ornerne fra stier, hvor der ved første prøveudtagning var påvist PRRS-virus i spytprøver, blev slagtet og på slagteriet blev ornernes tonsiller udtaget. Det var den samme person, der skar alle tonsiller ud med den samme kniv på slagtedagen. Tonsillerne blev pakket enkeltvis i poser og frosset ned.

Fødselsdato samt PRRS-vaccinationsdato blev indsamlet fra de slagtede orner.

PRRS-seropositiv ornestation

Ornerne har to veje ind på en ornestation: via Bøgildgård eller direkte fra en avlsbesætning. Både orner, der kommer fra Bøgildgård og fra en avlsbesætning, skal igennem en karantæneperiode, før de sættes ind på ornestationen. I det efterfølgende ses bort fra denne mellemliggende karantæne, og ornerne benævnes hhv. fra "avlsbesætning" eller fra "Bøgildgård".

På Bøgildgård blev ornerne vaccineret mod PRRS type 1 (Porcilis PRRS) og PRRS type 2 (Ingelvac PRRS@MLV) ved ankomst, når de var 4-5 uger gamle. Orner fra en avlsbesætning blev først vaccineret mod PRRS type 1 og PRRS type 2, når de var 5-5,5 måneder gamle.

En PRRS-seropositiv ornestation fik i juni 2020 påvist PRRS type 1 og fik salgsstop. Den 9. juni blev der udtaget blodprøver af samtlige 287 orner. Efterfølgende blev en del orner slagtet, for at nedsætte antallet af orner, der skulle have taget blodprøve før salgsstoppet kunne ophæves. Fra 66 orner blev tonsillerne udtaget på slagtelinjen på tre forskellige slagtedatoer (25. juni, 26. juni og 30. juni). Det var den samme person, der skar alle tonsiller ud med den samme kniv på de enkle slagtedage. Tonsillerne blev pakket enkeltvis i poser og frosset ned.

Fødselsdato blev indsamlet, så ornens alder ved blodprøvning og evt. slagtning kunne beregnes. Ligeledes blev oplysninger vedrørende om ornerne var kommet ind på ornestationen via Bøgildgård eller fra en avlsbesætning indsamlet.



Dyrlæge og tekniker klar til at udtage tonsiller på slagteriet.



Tonsillerne identificeres på laboratoriet og der tages materiale ud til undersøgelse.



Tonsil fra en orne.

Laboratorieanalyse

Undersøgelse for PRRS-virus blev udført ved RT-qPCR [9]. Prøver med en ct-værdi over 40 blev betegnet negative, prøver med en ct-værdi mellem 35-40 som svagt positive og prøver med en ct-værdi under 35 som stærkt positive.

Prøver fra Bøgildgård

Spytprøver fra første prøveudtagning blev undersøgt for PRRS-virus på laboratoriet på Danmarks Tekniske Universitet. Spyt- og blodprøver fra anden prøveudtagning, samt tonsiller, blev undersøgt for PRRS-virus på laboratoriet på Københavns Universitet (KU).

Prøver fra PRRS-seropositiv ornestation

Blodprøverne blev undersøgt for PRRS-virus på laboratoriet på Statens Serum Institut. Efterfølgende blev samtlige prøver undersøgt for antistoffer mod PRRS-virus ved multiplex (MIFA) for både PRRS type 1 og PRRS type 2 på Laboratoriet for Svinesygdomme i Kjellerup. Tonsillerne blev undersøgt for PRRS-virus på KU.

Sekventering af PRRS-virus

En PRRS-virus positiv tonsil blandt orner fra Bøgildgård (PRRS type 1) og en tonsil fra en orne fra den PRRS-seropositive ornestation blev udvalgt til sekventering.

Opgørelse af data

Andelen af PRRS-virus positive prøver blev opgjort. For Orner fra den PRRS-seropositive ornestation blev middelværdi og standardafvigelse af alder ved udtagning af blodprøve beregnet.

Resultater og diskussion

Bøgildgård

Spytprøver fra syv ud af 40 stier med PRRS-vaccinerede orner testede positiv for PRRS-virus ved første prøveudtagning (1. gang). I en sektion var fire stier positive, i de tre øvrige sektioner var der kun en positiv sti pr. sektion. Fordeling på PRRS-type og uger siden vaccination kan ses i tabel 1.

Tabel 1. PRRS-virus positive fund fordelt på sektion og sti samt uger siden PRRS-vaccination. Prøver første gang (1. gang) er udtaget ugen før prøver anden gang (2. gang). Der blev kun udtaget blodprøver anden gang.

Sektion	Sti	Antal grise i stien	Uger siden vaccination	Spyt		Blod 2. gang	
				1. gang, PRRS type og niveau	2.gang, PRRS type og niveau	Antal PRRS-virus positive grise	PRRS type og niveau
6	5	14	18	T1*, svag**	T1, svag	1	T1, stærk***
7	23	13	14	T1 og T2, svag	T1, svag	1	T1, stærk
8	1	8	14	T2, svag	Negativ	0	-
8	3	9	16	T2, svag	Negativ	0	
8	4	10	14	T2, svag	Negativ	0	-
8	5	8	15	T2, svag	Negativ	0	
17	29	14	14	T1, svag	Negativ	0	

*T1 = PRRS type 1, T2=PRRS type 2.

**Svag = Resultat fra PCR havde ct 35-40

***Stærk = Resultat fra PCR havde ct under 35

Ved anden prøveudtagning (2. gang) blev der udtaget spytp prøver fra syv stier og fra samtlige 76 orner i de syv stier. Kun to spytp prøver var PRRS-virus positive. I hver af de to stier blev der påvist en PRRS-virus positiv orne ud af blodprøver af alle de individuelle orner i stien. Det vil sige, at i alt to ud af de 76 orner havde PRRS-virus i blodet (tabel 1).

Ved første prøveudtagning blev der påvist både PRRS-virus type 1 og PRRS-virus type 2. Ved anden prøveudtagning blev der kun påvist PRRS-virus type 1 (tabel 1).

Da ornerne var et godt stykke fra vaccination (14-18 uger) ved første prøveudtagning og de kun blev fundet svagt PRRS-virus positive, var det formodentlig meget naturligt, at færre orner var PRRS-virus positive ugen efter ved anden prøveudtagning.

På slagtelinjen lykkedes det at udtage tonsiller fra 12 orner fra sti 5 og fra 11 orner fra sti 23. Alle tonsiller blev fundet positive for PRRS-virus, 22 for PRRS-virus type 1 og 16 for PRRS-virus type 2 (tabel 2).

vaccineret ved 4-5 ugers alderen ved ankomst fra en avlsbesætning til Bøgildgård eller ved 5-5,5 måneders alderen ved ankomst direkte fra en avlsbesætning (tabel 3).

Tabel 3. Fordelingen af ornerne som var positive og negative for PRRS-antistoffer på en PRRS-seropositiv ornestation.

Oprindelse	Alder ved PRRS-vaccination	Positiv for antistoffer mod PRRSV	Negativ for antistoffer mod PRRSV
Bøgildgård	4-5 uger	204	42
Avlsbesætning	5-5,5 måneder	34	7

I gennemsnit var PRRS-antistof positive orner fra avlsbesætninger 674 dage gamle (std 112) (seks orner indgik ikke i den beregning pga. manglede fødselsdato) og fra Bøgildgård 475 dage (std 176). PRRS-antistof negative orner fra avlsbesætninger var i gennemsnit 664 dage gamle (std 150) og fra Bøgildgård 552 dage (std 182). Generelt var orner fra avlsbesætninger således ældre end orner fra Bøgildgård.

Når ornerne er vaccineret mod begge typer af PRRS, giver MFIA ratioen ikke så meget mening. MFIA er beregnet til at fange PRRS-typen i nyssmittede besætninger eller hvor man skal dokumentere, at man fortsat kun har den ene PRRS-type. Derfor kan det ikke afgøres, om det primært er antistoffer mod PRRS type 1 eller mod PRRS type 2, ornerne mister.

Der blev udtaget tonsiller fra 63 orner på tre forskellige slagtedatoer (25. juni, 26. juni og 30. juni). Som det var tilfældet for Bøgildgårdornerne, blev alle tonsillerne udtaget på slagtelinjen, uden skift af kniv eller handsker mellem hver orne og af den samme person de enkelte slagtedage. Kun tre orner var positive for PRRS-virus i tonsillen, og alle tre var PRRSV type 1. Det ser derfor ud til, at orner kan være PRRS-virus positive i tonsillerne og samtidig teste PRRS-virus negativ på blodprøve. Om ornerne ville have testet positive for PRRS-virus, da de opfølgende prøver i forbindelse med fritesting af ornestationen blev taget på ornestationen, vides ikke. De tre orner var alle kommet ind på ornestationen via Bøgildgård, en orne havde ikke PRRS-antistoffer, de to andre orner havde PRRS-antistoffer.

Det vides ikke, om de PRRS-virus positive tonsiller stammer helt tilbage fra PRRS-vaccination eller fra en nylig cirkulation af PRRS-virus blandt ornerne. Da ornerne var vaccineret på Bøgildgård, da de var fire uger gamle, og alle var over et år da tonsillerne blev udtaget, er det imidlertid meget lidt sandsynligt, at ornerne har haft PRRS-virus i tonsillerne så længe. I stedet er det mere sandsynligt, at PRRS-virus stammer fra den cirkulation af PRRS-virus, der var på ornestationen, da den blev lukket. Dette stemmer også overens med sekventeringen af PRRS-virus, som viste, at der var tale om et PRRS-feltvirus.

Sekventering

Sekvensanalysen viste, at PRRS-virus type 1 i tonsil fra Bøgildgård var 99,35 % identisk til Porcilis MLV i ORF5. PRRS-virus type 1 fra ornestationen var 98,51 % identisk til Porcilis i partiel ORF2 (606 nukleotider). Karakterisering af PRRS-virus i Danmark har vist, at der cirkulerer PRRS-virus, der har en høj grad af lighed med den PRRS-stamme, der er i Porcilis PRRS MLV vaccinen. Endvidere er det kendt, at PRRS-vaccinevirus ved cirkulation mellem grise ændrer sig. På denne baggrund kan det ikke med sikkerhed fastslås, om de to PRRS-virus repræsenterer "felt virus" eller om det er PRRS-vaccinevirus, der er påvist i tonsillerne. Ved at sammenholde sekventeringsdata med de epidemiologiske data og kendskab til forløbet i de to besætninger, er det mest sandsynligt, at virus fra Bøgildgårdornerne er PRRS-vaccinevirus og PRRS-virus fra ornestationen er et "Porcilis PRRSV-lignende" feltvirus, der er blevet introduceret til ornestationen.

Konklusion

På trods af, at få unge orner var PRRS-virus positive i spyt- og blodprøver, kunne der påvises PRRS-virus i tonsillerne i 23 ud af 23 orner 14-18 uger efter vaccination. Blodprøver fra ældre orner på en PRRS-seropositiv ornestation med salgsstop viste, at 20 % af 287 orner ikke havde målbare PRRS-antistoffer i blodet. Ud af 63 slagtede ældre orner havde tre PRRS-virus positive tonsiller på trods af, at de var PRRS-virus negative i blod.

Ved at sammenholde resultatet fra sekventering af PRRS-virus og kendskab til forløbet på hhv. Børgildgård og ornestationen, er det mest sandsynligt, at der er tale om to forskellige forløb. Det PRRS-virus, som blev isoleret fra Børgildgårdornerne, stammer fra PRRS-vaccinationen af ornerne, og det PRRS-virus, som blev isoleret fra ornestationen, stammer fra en introduktion af et PRRS-virus til ornestationen.

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] Duan, X., Nauwynck, H. J., Pensaert, M.B., 2014. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Archives of Virology* 142, 2483–2497.
- [3] Wills, R.W.; Doster, A.R.; Galeota, J.A.; Sur, J.; Osorio, F.A. (2003): Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Microbiology.* 41, pp. 58-62.
- [4] 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
- [5] 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>
- [6] 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.
- [7] Christopher-Hennings, J., Holler, L.D., Benfield, D.A.; Nelson, E.A., 2001. Detection and Duration of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Semen, Serum, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace Boars. *J Vet Diagnostic Investigation*, 13;2, pp. 133-142
- [8] Nielsen, J., Bøtner, A., 1997. Hematological and immunological parameters of 412-month old pigs infected with PRRS virus. *Veterinary Microbiology*, 55, 1-4, 289-294.
- [9] 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

Deltagere

Tekniker: Claus Olling Rasmussen, Peter Nøddebo

NAV nr.: 1170

//KMY//

Dyregruppe: Grise, orner

Fagområde: Veterinær

Nøgleord: PRRS, PRRSV, vaccination, virus, tonsiller, viræmi,



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.