

NOVEL METHODS OF DETECTION OF TORQUE TENO VIRUS (TTV) IN COMMERCIAL WEAN-TO-FINISH POPULATIONS CONCURRENTLY INFECTED WITH PRRSV, PCV2 AND INFLUENZA VIRUS

² R Pogranichniy, ¹ J Prickett, ¹ R Main, ² A. Clark, ¹ J Zimmerman

¹College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, IA.

²Animal Disease Diagnostic Laboratory, Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN

*Corresponding author at: Roman Pogranichniy DVM, PhD, Animal Disease Diagnostic Laboratory School of Veterinary Medicine Purdue University, West Lafayette, Indiana

TTV is a small, non-enveloped, single-stranded, negative-sense, DNA virus belonging to genus Anellovirus in family Circoviridae.¹ TTV infections have been identified in swine, chickens, cows, sheep, cats, and dogs, but TTV's potential to cause disease largely remains undetermined. The purpose of this study was to describe the circulation of TTV in commercial wean-to-finish populations concurrently infected with PRRSV. The effect of TTV and interactions with co-infections (PRRSV, PCV2, influenza) on growing pig performance will be evaluated using weekly morbidity/mortality data, treatment data, and close-out data. Oral fluid samples were collected from 10 wean-to-finish sites at 2-week intervals from placement (3 weeks of age) to close-out. Samples were previously tested by PCR for PRRSV, influenza virus, and PCV2. Testing for TTV using PCR-based assays specific for genotypes 1 and 2 in is progress. Among 600 oral fluid samples, 120 have been tested. Twenty-five of 120 (21%) were positive for TTV-1 and 97 (80%) were positive for TTV-2. Twenty-three of the 25 TTV-1 positive samples were also positive for TTV-2. Preliminary data suggest that TTV infection was common in the 10 commercial wean-to-finish cohorts included in this survey.

TTV is a small, non-enveloped single stranded, negative-sense, circular DNA genome belonging to the genus *Anellovirus* in family *Circoviridae* (Okamoto et al., 2002). TTV has been associated with the development of non-A to G hepatitis in humans following blood transfusions, although Koch's postulates have not yet been fulfilled. Recently TTV was identified in domestic animals: swine, chickens, cows, sheep, cats, and dogs (Okamoto et al., 2002).

The genome of the swine TTV is approximately 2.8 kb and two distinct genogroups (genogroup 1 and genogroup 2) have been identified (Niel et al., 2005, Okamoto et al., 2002). The prevalence of TTV virus in swine in Europe and the U.S. ranges from 33-97 % (Kerarainen et al., 2006, McKeown et al., 2004). The disease-causing role of this virus in swine unknown at present. TTV has been found in swine showing clinical signs of porcine circovirus associated disease (PCVAD), but it is also found in clinically healthy animals (Kerarainen et al., 2006). Disease has not been reproduced in any species and its role in pathogenesis is unknown.

Diagnostic testing based on oral fluid specimens has been implemented extensively in human diagnostic medicine since the mid-1980s and, more recently, in veterinary diagnostic medicine. Oral fluid offers distinct advantages over serum-based testing. In particular, specimens are easily collected by non-technical personnel or patients in their homes (Chiappin et al., 2007). As a result, oral fluid-based testing has facilitated the collection of large amounts of epidemiological data on significant infectious agents, e.g., HIV in Africa (Connolly et al., 2004; Fylkesnes and Kasumba, 1998) and Thailand (Frerichs et al., 1994) and measles in Europe (Ramsay et al., 1997), Ethiopia (Nigatu et al., 2008), Brazil (de Azevedo Neto et al., 1995; Oliveira et al., 1998), and Africa (Ohuma et al., 2009).

In swine, methods of oral fluid collection and testing for PRRSV, PCV2, and influenza virus have been described (Prickett et al., 2008a,b; Irwin et al., 2009).

The objective of this study was to characterize the frequency of TTV virus in oral fluid samples from commercial swine previously tested for PRRSV, PCV2, and influenza virus.

METHODS. Experimental Design

On each of 10 sites, oral fluid samples were collected from 6 pens in one barn at 2-week intervals from placement to slaughter. Thereafter, samples were assayed for PRRSV, PCV2, SIV, and TTV by PCR-based assays.

Sample Collection

Standard operating procedures (SOPs) were developed to ensure the collection (Figure 1) of uniform, clean, and clearly identified samples and their submission to the diagnostic lab. Investigators demonstrated the first two collections and trained site personnel in the procedure. Once trained, site managers were responsible for the timely collection and submission of samples.



Figure 1. Step-wise photo series of oral fluid collection (Pictures courtesy of Dr. Keith Erlandson)

Sample collection "kits" containing all of the required materials were assembled and delivered to each site prior to the commencement of the study. Each kit included a pre-cut length of cotton rope, scissors, poly-boots, screw cap tubes, permanent markers, diagnostic submission forms, ice packs, zip-lock bags, and postage-paid addressed shipping containers.

Sampling Handling and Testing

Upon arrival to the Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory, oral fluid samples were centrifuged at 9000 x g for 10 min. Prior to testing, all samples were completely randomized and re-labeled. The oral fluid samples were tested by PCR for PRRSV, SIV, PCV2, and TTV.

RESULTS AND DISCUSSION

1. The results presented here represent the preliminary report of a field study involving disease surveillance using oral fluids. Formal analyses are in progress.

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія

2. Figure 2 displays the PCR results on oral fluid samples collected from 60 pens from wean to finish. The bars display the proportion of pens that tested PCR-positive for TTV1, TTV2, SIV, PCV2, and PRRSV by sampling point. The lines track the mean quantitative PCR virus titers for each pathogen.

3. Overall, the PCR results demonstrated that the circulation of pathogens in growing pig populations can be tracked using oral fluid samples.

4. Oral fluid sampling offers a cost effective solution to infectious disease surveillance in populations of growing swine and offers a new tool for studying the ecology and economics of emerging (TTV) and endemic (SIV) viruses in commercial swine populations.

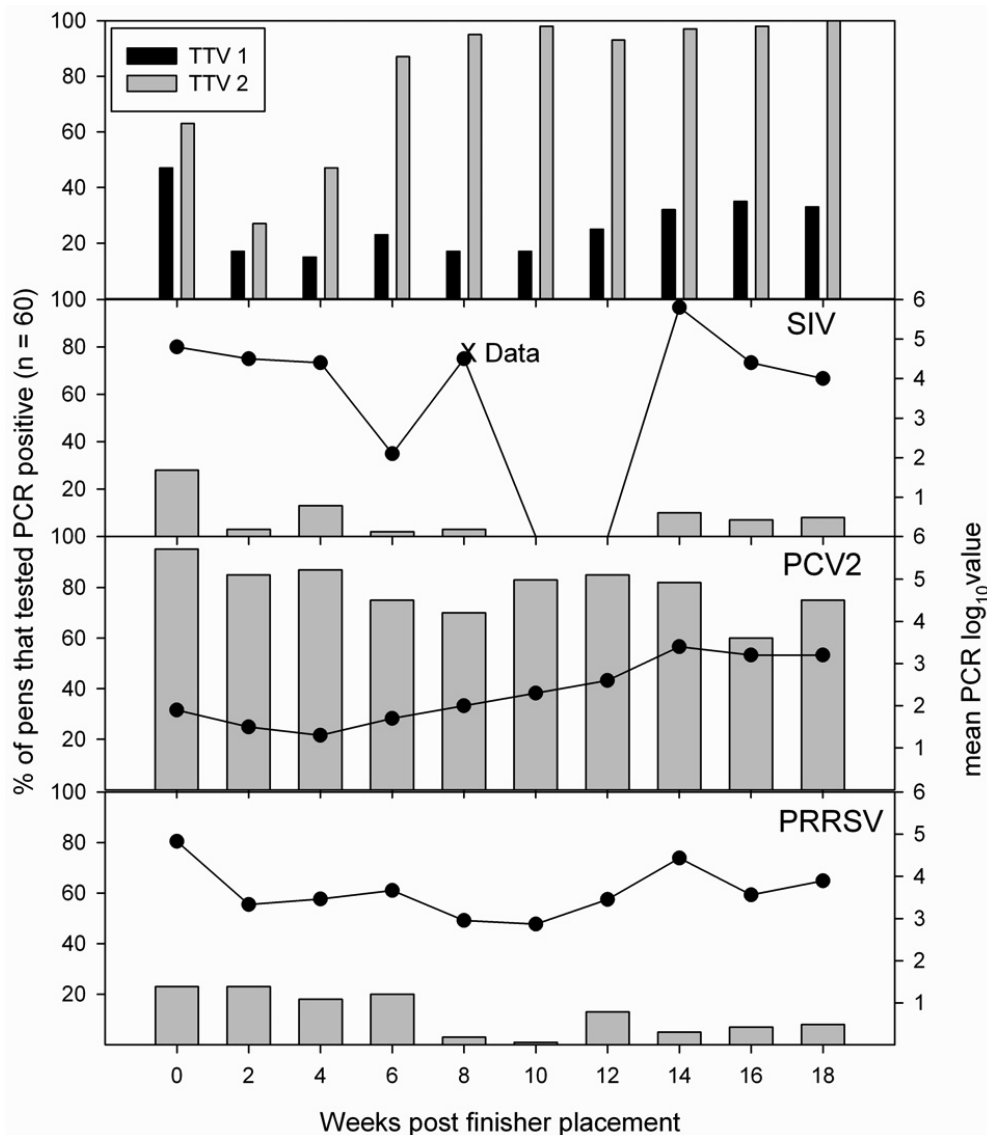


Figure 2. Oral fluid PCR results: TTV, SIV, PCV2, and PRRSV

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by Pork Checkoff funds provided through the National Pork Board (NPB #09-134) and Pfizer Animal Health (Dr. Steve Sornsen).

Special Thanks to Ann and Ernie Kurtz, Murphy- Brown LLC. Western Operations and Pat Hoffmann, Iowa State University College of Veterinary Medicine

References

- Chiappin, S, et al. 2007. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta* 383:30-40.
- Connolly, C, et al. 2004. Epidemiology of HIV in South Africa--results of a national, community-based survey. *South African Medical Journal* 94:776-781.
- de Azevedo et al. 1995. Salivary antibody detection in epidemiological surveys: a pilot study after a mass vaccination campaign against rubella in Sro Paulo, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89:115-118.
- Frerichs et al. 1994. Saliva-based HIV-antibody testing in Thailand. *AIDS* 8:885-894.
- Fylkesnes, K. and Kasumba, K. 1998. The first Zambian population-based HIV survey: saliva-based testing is accurate and acceptable. *AIDS* 12:540-541.
- Irwin, C, et al. 2009. RT-PCR detection of H3N2 influenza virus in oral fluid samples from experimentally infected pigs. 52st Annual Conference, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. San Diego, California, p. 66.
- Kekarainen, T, et al. 2006. Prevalence of swine Torque teno virus in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J Gen Virol* 87:833-837.
- McKeown, N, et al. 2004. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet Microbiol* 104:113-117.
- Niel, C, et al. 2005. Rolling-circle amplification of torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J Gen Virol* 86:1343-1347.
- Nigatu, D, et al. 2008. Evaluation of a measles vaccine campaign in Ethiopia using oral-fluid antibody surveys. *Vaccine* 26:4769-4774.
- Ohuma et al. 2009. Evaluation of a

measles vaccine campaign by oral-fluid surveys in a rural Kenyan district: interpretation of antibody prevalence data using mixture models. *Epidemiol Infect* 137:227-233. **12.** Okamoto et al. 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J Gen Virol* 83:1291-1297. **13.** Oliveira et al. 1998. Salivary diagnosis of measles for surveillance: a clinic-based study in Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92:636-638. **14.** Prickett et al. 2008a. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: A longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest* 20:156-163. **15.** Prickett, J, et al. 2008b. Surveillance of commercial growing pigs for PRRSV and PCV2 infections using pen-based oral fluid samples: A pilot study. *J Swine Health Prod* 16:86-91. **16.** Ramsay, M, et al. 1997. Surveillance of measles in England and Wales: implications of a national saliva testing programme. *Bull WHO* 75:515-521.

НОВІТНІ МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ TORQUE TENO ВІРУСУ (TTV) У КОМЕРЦІЙНИХ ВІДЛУЧЕНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ, ОДНОЧАСНО ІНФІКОВАНИХ РЕПРОДУКТИВНИМ І РЕСПІРАТОРНИМ СИНДРОМОМ ВІРУСУ СВИНЕЙ (PRRSV), ЦИРКОВІРУСОМ СВИНЕЙ 2 ТИПУ (ЦВС2) ТА ВІРУСОМ ГРИПУ

Пограничний Р.², Прікет Дж.¹, Мейн Р.¹, Кларк А.², Зіммерман Дж.¹

¹Коледж ветеринарної медицини, Державний університет, м. Еймс, Айова, ²Лабораторія діагностики хвороб тварин, Відділ порівняльної патобіології, Університет Пердю, Західний Лафейет, Індіана

Метою дослідження було описати циркуляцію Torque Teno вірусу (TTV) у комерційних відлучених популяціях, одночасно інфікованих репродуктивним і респіраторним синдромом вірусу свиней (PRRSV). Вплив TTV та взаємодії з суміжними інфекціями (PRRSV, PCV2 і грип) на зростання якості свиней буде вивчатись з використанням щотижневих даних захворюваності/смертності, лікування, а також даних розпродажу. Попередні дані свідчать про те, що інфекція TTV була загальною для 10 комерційних відлучених когорт, враховуючи ті, що розглянуті у даному спостереженні.

УДК 619:578.832.1:636.5

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГРИППА А/Н5N1, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2005 ГОДУ

Абрамова Л.Ю.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), г. Москва

Чвала И.А., Андриясов А.В., Пчелкина И.П., Манин Т.Б., Мудрак Н.С., Ирза В.Н., Борисов А.В., Дрыгин В.В., Старов С.К.

ФГУ Федеральный центр охраны здоровья животных, г. Владимир

Yu Q., Miller P.J.

Юго-восточная лаборатория болезней птиц, США

В июле 2005г. на территории Новосибирской области Российской Федерации были зарегистрированы случаи болезни среди диких и сельскохозяйственных птиц, имевших острое течение и высокую смертность. Позднее вспышки болезни были зафиксированы в Омской, Тюменской, Курганской и Челябинской областях, а затем и в других регионах страны, соседних государствах (2, 3, 4, 8). Стремительное распространение болезни, вызванной вирусом высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N1, случаи заболевания и гибели млекопитающих, огромный экономический ущерб потребовали как организации и проведения целого комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий внутри страны, так и их гармонизации на международном уровне.

Одним из направлений научно-исследовательских работ было изучение молекулярно-биологических свойств занесенного инфекционного агента, а также разработка, стандартизация и внедрение в ветеринарную практику современных средств и методов лабораторной диагностики. Одной из острых проблем оказалось своевременное обнаружение, идентификация и характеристика вируса, что существенно затрудняло принятие надлежащих мероприятий по локализации и ликвидации очага болезни.

Используя молекулярно-генетические методы диагностики, такие как ПЦР и нуклеотидное секвенирование, можно определить нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт нарезания белка гемагглютинина (НА), что позволяет оценить вирулентность исследуемого изолята вируса гриппа птиц (ВГП). Результаты молекулярно-генетических исследований позволяют поставить диагноз в сжатые сроки, однако решающее значение при изучении патогенных свойств вируса имеют эксперименты с использованием лабораторных животных. В настоящее время одним из основных методов оценки вирулентности изолятов ВГП (5, 8) является определение индекса патогенности при внутривенном заражении цыплят (IVPI).

Из различных регионов России и ближнего зарубежья в ФГУ Федеральный центр охраны здоровья животных поступали для лабораторного исследования пробы патологического материала, отобранные как при вспышках заболевания, так и в результате мониторинговых мероприятий. Благодаря предпринятым мероприятиям, а также организации прямого сотрудничества между ФГУ ВНИИЗЖ и региональными ветеринарными службами, были изучены некоторые клинические признаки и патологоанатомические изменения у различных видов диких и сельскохозяйственных птиц в полевых условиях, собраны пробы биоматериала. В данной работе рассмотрены четыре случая болезни, произошедшие в период с июля по декабрь 2005г. в различных субъектах России, изучены вирулентные свойства выделенных изолятов вируса гриппа птиц А/Н5N1, описаны особенности течения болезни.

Материалы и методы. *Вирус гриппа.* В работе использовали изоляты ВГП А/Н5N1:

– A/wild duck/Tumen/233/05, выделенный из пробы паренхиматозных органов, трахеи и головного мозга дикой утки, отобранной в Армизонском районе Тюменской области в июле 2005г.;

– A/turkey/Tula/551/05, выделенный из пробы паренхиматозных органов, отобранной в д. Яндовка Ефремовского района Тульской области в октябре 2005г.;

– A/swan/Astrakhan/598/05, выделенный из пробы паренхиматозных органов, кишечника, трахеи и головного мозга лебедя, отобранной в Камызякском районе Астраханской области в ноябре 2005г.;