

PRRS-VIRUS KAN PÅVISES I SPYTPRØVER

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

^a SEGES Svineproduktion, Den rullende Afprøvning, ^b Københavns Universitet

STØTTET AF

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

Det er muligt at bruge spyt i stedet for blod ved overvågning af frihed for PRRS-virus på eks. ornestationer. I en undersøgelse kunne der påvises PRRS-virus i alle virustilsatte spytp prøver, selvom 17 % af ornerne havde hæmmende substanser i spyttet. Sammenblanding af spytp prøver med hæmmende substanser i en pool medførte ikke, at resultatet af testen blev hæmmet mere end ved prøver fra enkelte orner.

Sammendrag

PRRS-virus blev tilsat 104 negative spytp prøver fra orner fra PRRSV-negative ornestationer. Der kunne påvises PRRS-virus i alle spikede (virustilsatte) spytp prøver, og selvom spyttet fra nogle orner hæmmede (inhiberede) PCR-reaktionen, så mindre virus blev påvist i prøven, havde det mindre indflydelse på resultatet af test af poolede prøver. Der blev fundet inhibition på tre af fem ornestationer i varierende grad (13-34 %).

Spytp prøver har en stor fordel, fordi prøverne kan udtages af personalet, og ornen/grisen ikke skal fikseres under prøveudtagelsen, hvilket øger arbejdssikkerheden og dyrevelfærden under prøveudtagelse. Som de fem deltagende ornestationer erfarede, kan det være en udfordring at få ældre orner/grise til at interessere sig for det sterile bomuldsreb til prøveudtagelsen uden forudgående træning eller smags-/lugttilsætning.

Spytp prøverne blev indsamlet fra ornerne vha. et bomuldsreb, som spyttet blev vredet af, når ornen havde tygget på det. På laboratoriet blev spytp prøverne tilsat en veldefineret mængde virus (spiket), og de spikede prøver og kontrolprøver (vand tilsat samme mængde virus) blev analyseret med RT-qPCR. Spytp prøver med ct-værdier, der afveg mere end +2,0 fra kontrolprøver, blev karakteriseret som spyt med inhibition. Ct-afvigelse under 2,0 blev betragtet som normale udsving i testen.

Baggrund

Ved overvågning af PRRS på ornestationer udtages ugentlige blodprøver fra en stikprøve af tilfældige orner, der testes for PRRS-virus (PRRSV). Blodprøver kan hurtigt udtages ved samarbejde mellem dyrlæge og medarbejdere men kræver, at ornen kortvarigt fikseres med en trynebremse. PRRSV kan påvises i både serum (blodprøver), bloddråber, spyt, sæd, lymfevæv og testikler [1,2,3,4,5], hvor spyt kan udtages under størst hensyn til grisens velfærd, da der ikke bruges fiksering under prøveudtagelsen. Orner kan risikere at blive testet for PRRSV flere gange i deres liv. Gentagen fiksering kan medføre, at ornerne bliver sky eller mistroisk overfor personalet, hvilket kan føre til farlige situationer for medarbejderne under håndtering af ornerne. Derfor kan spytp prøver være med til både at øge velfærden for ornerne og arbejdssikkerheden for medarbejderne.

PRRSV findes mere konsekvent i blod og spyt, fordi PRRSV spredes i kroppen via blod og ser ud til at have stor præference for lymfevæv, f.eks. tonsiller (mandlerne i svælget). Studier viser, at PRRSV kan påvises i alle smittede grise både i blod og spyt inden for de første fire dage efter infektion, hvor PRRSV findes lidt tidligere i blodet (under 24 timer før) end i spyt og næsesvaber [1,6,7].

PRRSV kan også udskilles i sæd, men denne udskillelse er uforudsigelig. Ofte udskiller langt under halvdelen af ornerne PRRSV i sæden, især i den første uge efter infektion [5,7,8,9,10]. Derudover kan der være ophold i virusudskillelsen i sæd, hvor der i nogle dage ikke kan påvises PRRSV i sæden, ligesom niveauet kan være meget lavt. I 2020 blev der fundet otte PRRSV-positive orner ved PCR-test af blodprøver fra en PRRS-positiv ornestation. Derimod kunne der ikke påvises PRRSV ved PCR af sæden fra de otte orner [11]. Efterfølgende viste det sig, at sæden alligevel kunne inficere fravænningsgrise, hvor de ved et forsøg fik sæden sprøjtet ind i bughulen. Det er ikke undersøgt, om sæden kunne overføre PRRS til søer ved insemination. Forsøget bekræftede, at det ikke er muligt at fri-teste sæd med PCR ved direkte test af sæden.

Spyt har mange funktioner, herunder at være første trin i fordøjelsen og beskytte mundhulen mod infektioner. Det indeholder derfor en række forskellige substanser, f.eks. enzymer, som nedbryder føde, mikroorganismer og rester af foderpartikler. Nogle af de substanser kan sandsynligvis virke hæmmende (give inhibition) ved at nedbryde selve PRRSV i mundhulen eller på reagenserne i virustesten [12] og påvirke testens sensitivitet, dvs. hvor præcis testen er til at påvise virus i prøver. Det kan korrigeres ved at øge stikprøvestørrelsen men forudsætter, at man ved, hvor mange og hvor meget prøverne hæmmes. Formålet med denne afprøvning var at undersøge, hvor meget PRRSV der hæmmes i spytp prøver fra orner for at kunne, tage højde for det ved fastlæggelse af PRRS-overvågning af ornestationer.

Materialer og metoder

Der blev udtaget spytprøver fra 104 orner opstaldet på fem PRRS-negative ornestationer. Spytprøverne blev taget ved hjælp af bomuldsreb, som blev hængt op i stierne ved hver orne i 30-45 minutter. Derefter blev rebet lagt i en plastikpose, hvor spyttet blev vredet af rebet og overført til en steril beholder. Der blev brugt rene handsker ved håndtering af rebet.

Hvis ornen ikke havde udvist interesse for rebet, eller der ikke kunne vrides mindst 1 ml spyt af rebet, blev reb og spyt kasseret, og prøven blev forsøgt taget fra en ny orne eller den efterfølgende dag. Prøverne blev opbevaret ved -20 grader, indtil de skulle analyseres.

Spytprøverne blev sendt til Københavns Universitet, hvor de blev spiket med (tilsat) en kendt mængde PRRSV. Vand spiket med samme mængde PRRSV blev anvendt som positive kontroller (vandkontrol). Real-time RT-PCR for PRRSV blev kørt, og ct-værdierne for spiket spyt og spiket vand blev sammenholdt inden for samme oprensning. Afvigelser på ct-værdier +/- 1,1-2,0 mellem ct-værdier fra spiket spyt og spiket vand blev betragtet som almindelige usikkerheder som pippeteringsvariation, oprensningsvariation o.lign. Afvigelser på ct-værdier +2,1 eller mere mellem ct-værdier fra spiket spyt og spiket vand blev betragtet som tegn på inhibition (nedsat mængde virus påvist i prøve).

RT-PCR er en test, hvor virusmaterialet i en prøve opformeres i cyklusser til det kan måles (detektionsgrænsen). Ct-værdien angiver det antal cyklusser der skal til for at opformere virusets arvemateriale til detektionsgrænsen, dvs. tallet kan ligge mellem 0 og 40 (eller det maksimale antal cyklusser der køres). Jo lavere værdi, desto mere virus er der i prøven.

Resultater og diskussion

Ornerne var 6-36 måneder gamle og havde været på ornestationen i 19-881 dage, da spytprøverne blev taget. Prøverne blev taget fra hhv. 83 Duroc, syv Landrace og syv Yorkshire orner.

Der kunne påvises PRRSV i de spikede prøver fra alle 104 orner, men i 18 (17 %) af prøverne blev der påvist inhibition, dvs. der blev påvist mindre virus, end det prøverne var spiket med (Tabel 1). Spikningsproceduren for de 18 prøver blev gentaget med samme resultat. Der blev fundet inhibition i de spikede prøver fra både Duroc og Landrace orner men ikke fra Yorkshire orner. Sandsynligvis er det en tilfældighed pga. få prøver fra Yorkshire orner. Inhibition kan skyldes en række forskellige parametre herunder forskelle i fodersammensætning, fodringstidspunkt i forhold til udtagelse af prøver, grisens immunstatus, mm. Ornernes alder og opholdstid på ornestationen så ikke ud til at have indflydelse på inhibition i spyttet (Tabel 1). De spikede prøver med inhibition blev fundet på tre af fem ornestationer med en forekomst i hhv. 13 %, 23 % og 34 % af spytprøverne.

Den gennemsnitlige grad af inhibition var 3,54 ct-enheder, hvilket svarer til, at den målte mængde virus var ca. 1 log₁₀ mindre end den tilsatte (sande) koncentration. I praksis betyder dette, at følsomheden af testen er nedsat med ca. 1 log₁₀, hvilket igen betyder, at test af svagt positive prøver (prøver med en ct-værdi mindre end 3,5 ct-værdier under cut off-værdien) vil generere et falsk negativt svar. Typiske cut-off værdier for PRRSV RT-qPCR assays er ct 37-39.

Tabel 1. Antal orner med og uden inhibition i spyt, analyse-afvigelse (ct-afvigelse) fra kontrolprøver, alder og opholdstid på ornestation.

Orner	Med inhibition	Uden inhibition
Antal	18	86
Ct-afvigelse (+/-std)	3,54 (+/- 1,23)	0,22 (+/- 0,8)
Alder (+/-std)	414 (+/-165)	441 (+/- 170)
Opholdstid på ornestation	203 (+/- 159)	245 (+/- 172)

Efterfølgende blev pools testet med forskellige kombinationer af enkeltprøver med forskellige grader af inhibition. Der blev testet syv pools med fem prøver og tre pools med ti prøver. Tre af disse pools gav et resultat, der afveg mere end 2 ct-værdier fra resultatet af den spiked vandkontrol. Poolen med den største afvigelse viste et resultat, der var 5,5 ct-enheder højere end vandkontrollen og 2,2 ct-enheder højere end gennemsnittet af de resterende prøver i poolen. Denne pool indeholdt tre prøver, der enkeltvis inhiberede reaktionen med over 2 ct-enheder, og to prøver, der enkeltvis havde inhiberet reaktionen med 1-2 ct-enheder. Test af de øvrige pools gav resultater, der ikke afveg mere end 2 ct-værdier fra test af den spiked vandkontrol. I nogle tilfælde gav poolen endda ct-værdier, der var lavere end det forventede gennemsnit af de enkeltprøver, der indgik i den pågældende pool. Dette var også tilfældet for tre pools, der indeholdt to-tre prøver, som i enkelttest havde inhiberet reaktionen med mere end 2 ct-enheder. Dette skyldes formodentligt, at de inhiberende substanser i enkeltprøven fortyndes, når prøven indgår i en pool.

Tabel 2. Resultat af test af pools med forskellige kombinationer af fem (pool 1-7) eller ti (pool 8-10) prøver. Antal > 2 ct, antal 1-2 ct samt antal < 1 ct angiver antallet af prøver, der indgik i poolen, som individuelt gav et testresultat, der oversteg vandkontrollen med hhv. > 2, mellem 1-2 og under 1 ct-værdi.

Pool nr.	Antal prøver pr. pool	Antal prøver i poolen inddelt efter ct-afvigelse fra vandkontrol			Ct-afvigelse af pool fra gennemsnit af enkeltprøver	Ct-afvigelse af pool fra vandkontrol
		> 2 ct	1-2 ct	< 1 ct		
1	5	3	2	0	2,2	5,5
2	5	3	1	1	-1,9	0,2
3	5	2	1	2	-1,4	0,3
4	5	0	3	2	0,3	1,5
5	5	1	0	4	0,2	1,2
6	5	2	0	3	0,7	2,9
7	5	2	0	3	-1,6	-0,4
8	10	6	3	1	2,0	4,7
9	10	2	4	4	-0,9	0,5
10	10	3	0	7	0,0	-1,6

Testen af pools antyder således, at hvis den pågældende pool indeholder flere enkeltprøver med en høj grad af inhibition, kan disse prøver i nogle tilfælde medføre nedsat følsomhed af testen, mens det i andre tilfælde ikke har væsentlig betydning for resultatet.

Den potentielt nedsatte følsomhed både som følge af pooling af prøver og inhiberende stoffer i prøvematerialet bør indgå i vurderingen af stikprøvestørrelsen ved overvågning af ornestationer. Orner har vist at udskille virus i kortere tid og i lavere mængder end grise i vækst, men de fleste studier påviser dog virus i de fleste orner i perioden fra tre-fire dage til 14 dage efter infektion [13].

Der er ikke tidligere udtaget spytprøver fra ornerne, der indgik i denne afprøvning. Medarbejderne på ornestationerne meldte tilbage, at processen var mere tidskrævende, bl.a. fordi ornerne generelt var

uinteresserede i at bide i bomuldsrebet. Samme erfaringer er beskrevet i udenlandske studier, hvor det bemærkes, at især ældre dyr som søer og orner er mindre interesserede i at undersøge nyt i stien [14]. Her afprøvede man forskellige løsningsforslag, hvor de fleste tager udgangspunkt i at give rebet smag og lugt, som er interessant for grisene, f.eks. ved at gennemvæde rebet med æblejuice og tørre det [6,14,15]. Ulempen er, at prøvematerialet risikerer at blive uens og/eller forurenede og kan i værste fald påvirke analyseresultatet, da reb med smag/lugt ikke kan købes præfabrikeret. Et enkelt studie konkluderede, at æblejuice ikke påvirkede analysen af spyttet, men der findes mange æblejuice-varianter, og det vil være meget ressourcekrævende at undersøge om det gælder for alle varianter. Til gengæld erfarede samme studie, at de enkelttopstaldede orner fik mere interesse for det æblejuice-tørrede reb i løbet af ganske kort tid. Det bør derfor undersøges, om udtagelsen af spytpåvæksler fra ornerne kan lettes ved at træne dem forud for udtagelsen. For eksempel ved at hænge reb med en tiltrækkende smag eller lugt i stien i en periode inden prøveudtagelsesdagen og derefter hænge et rent bomuldsreb op på selve prøveudtagelsesdagen.

Indsamling af fråde fra ornerne i forbindelse med sædtapning vil være en relativ let måde at indsamle prøvemateriale, men et studium viste en noget lavere følsomhed end spyt, hvorfor yderligere valideringer er påkrævet før dette prøvemateriale kan tages i anvendelse [13].

Konklusion

Resultaterne af dette forsøg viste, at op mod hver femte prøve kan indeholde inhiberende stoffer, der nedsætter følsomheden af den anvendte PCR-test. Dette vil dog primært have betydning for prøver, hvor mængden af virus er tæt på testens detektionsgrænse. Det er derfor muligt at bruge spyt i stedet for blod, når der skal overvåges for PRRS-frihed på f.eks. ornestationer.

Hvis spytpåvæksler skal anvendes til overvågningen af PRRSV på ornestationer, bør denne risiko for nedsat følsomhed tages i betragtning i overvågningsdesignet. Dette gælder også i de tilfælde, hvor der ønskes at teste spytpåvæksler i pools.

Spytpåvæksler har en stor fordel over blodprøver, fordi prøverne kan udtages af personalet, og ornen/grisen skal ikke fikseres under prøveudtagelsen. Dette øger arbejdssikkerheden og dyrevelfærden under prøvetagningen. Til gengæld kan det være en udfordring at få ældre orner/grise til at interessere sig for det sterile bomuldsreb uden forudgående træning eller smags-/lugttilsætning.

Referencer

- [1] Kristensen, C.S.; Pawlowski, M.Q.; Thoning, H.; Carlsen, S.H.; Kvisgaard, L.; Larsen, L.E. (2016): Effekt af enkelt versus dobbelt PRRSV vaccination. SEGES Svineproduktion, Meddelelse nr. 1068.
https://svineproduktion.dk/publikationer/kilder/lu_medd/2016/1068
- [2] Kristensen, C.S.; Bourry, O.; Kvisgaard, L.K.; Larsen, L.E. (2020): Inokulering af naive og vaccinerede grise med PRRSV-varianten fra Horsens. SEGES Svineproduktion. Meddelelse nr. 1211.
https://svineproduktion.dk/publikationer/kilder/lu_medd/2020/1211
- [3] Trang, N.T.; Ngan, P.H.; Hop, N.V.; Hirai, T. (2018): Nasal swab – a new tool for the detection of porcine respiratory disease complex in natural infected pigs. Acta scientific microbiology, 1, pp. 2-5.
- [4] Gerber, P.F.; O'Neill, K.; Owolodun, O.; Wang, C.; Harmon, K.; Zhang, J.; Halbur, P.G.; Zhou, L.; Meng, X.; Opriessnig, T. (2013): Comparison of commercial Real-time reverse transcription-PCR assays for reliable, early and rapid detection of heterologous strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in

experimentally infected or noninfected boars by use of different sample types. *Journal of clinical microbiology*, 51, pp. 547-556.

- [5] Prieto, C; García, C.; Simarro, I; Castro, J.M. (2003): Temporal localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in reproductive tissues of experimentally infected boars. *Theriogenology*, 60, pp. 1505-1514
- [6] Kittawornrat, A.; Prickett, J.; Chittick, W.; Wang, C.; Engle, M.; Johnson, J.; Patnayak, D.; Schwartz, T.; Whitney, D.; Olsen, C.; Schwartz, K.; Zimmerman, J. (2010): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: Will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus research*, 154, pp. 170-176.
- [7] Reicks, D.L.; Muñoz-Zanzi, C.; Rossow, K. (2006): Sampling of adult boars during early infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus for testing by polymerase chain reaction using a new blood collection technique (blood-swab method). *Journal of Swine Health and Production*, 14, pp. 258-264.
- [8] Han, K.; Seo, H.W.; Oh, Y.; Kang, I.; Park, C.; Han, J.H.; Kim, S.-H.; Chae, C. (2013): Pathogenesis of type 1 (European genotype) porcine reproductive and respiratory syndrome virus in male gonads of infected boar. *Veterinary Research Communication*, 37, pp. 155-162.
- [9] 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13, pp. 133-142.
- [10] 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7, pp. 456-464.
- [11] Kristensen, C.S.; Kvisgaard, L.K.; Hjulsager, C.K.; Krog, J.S.; Larsen, L.E. (2020): Udbrud af PRRS1 på en PRRS-seropositiv ornestation efterfulgt af et eksperimentielt forsøg. SEGES Svineproduktion. Meddelelse nr. 1210. https://svineproduktion.dk/publikationer/kilder/lu_medd/2020/1210
- [12] Nielsen, G.B.; Nielsen, J.P.; Haugegaard, J.; Leth, S.C.; Larsen, L.E.; Kristensen, C.S.; Pedersen, K.S.; Stege, H.; Hjulsager, C.K.; Houe, H. (2018): Comparison of serum pools and oral fluid samples for detection of porcine circovirus type 2 by quantitative real-time PCR in finisher pigs. *Porcine Health Management*, 4, pp. 1-10
- [13] Pepin, B.J.; Kittawornrat, A.; Liu, F.; Gauger, P.C.; Harmon, K.; Abate, S.; Main, R.; Garton, C.; Hargrove, J.; Rademacher, C.; Ramirez, A.; Zimmerman, J. (2013): Comparison of specimens for detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boar studs. <https://doi.org/10.1111/tbed.12135>.
- [14] Fablet, C; Renson, P.; Pol, F.; Dorenlor, V.; Mahé, S.; Eono, F.; Eveno, E.; Le Dimna, M.; Liegard-Vanhecke, D.; Eudier, S.; Rose, N.; Bourry, O. (2017): Oral fluid versus blood sampling in group-housed sows and finishing pigs: Feasibility and performance of antibody detection for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary microbiology*, 204, pp. 25-34.
- [15] Kittawornrat, A.; Engle, M.; Panyasing, Y.; Olsen, C.; Schwartz, K.; Rice, A.; Lizano, S.; Wang, C.; Zimmerman, J. (2013): Kinetics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) humoral immune response in swine serum and oral fluids collected from individual boars. *BMC Veterinary Research*, 9, pp. 1-11.

//DOPF//

Dyregruppe: Orner
Fagområde: Diagnostik, Overvågning, Veterinær
Nøgleord: PRRSV, PRRS-virus, virus, orner, spytpøver



Tlf.: 33 39 45 00

svineproduktion@seges.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.