



Følsomhed af PCR-test for PRRS-virus på væske fra testikler og haler

Hanne Bak^a, Aida Droce^a, Kristian Møller^a

^a Landbrug & Fødevarer Gris

STØTTET AF:

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

Denne undersøgelse viste, at kun knap 1/3 af PCR-tests på 20 kuld vil have positivt svar, hvis der kun er testikler fra en enkelt moderat PRRS positiv hangris i posen, og at der ikke kan forventes positiv PCR for processing fluids (PF) fra 20 kuld, hvis det eneste positive materiale i prøven er en hale. Derfor anbefales færre kuld pr. pose, når man er sidst i PRRS saneringsforløbet, samt at perioden med indsamling af PF altid efterfølges af en periode med test af fravænningsgrise.

Sammendrag

PCR-test af testikler og haler (processing fluid, PF) indsamlet ved kastration og halekupering af pattegrise er hyppigt anvendt som en simpel metode til at overvåge PRRS-virus i farestalden. Fordelene ved at anvende PF til overvågning for PRRS-virus er især, at der ikke skal tages blodprøver, og at man kan teste materiale fra mange dyr på en gang og øge sandsynligheden for at finde de PRRS-positive dyr. I besætninger, hvor der kun er ganske få positive dyr, er der dog en risiko for, at man ved sammenblanding af materiale fra mange dyr kan fortynde væsken fra eventuelle positive dyr så meget, at testen giver negativt resultat, selvom der indgår grise med PRRS-virus i prøven. Amerikanske forskere har vist, at en enkelt positiv hangris medfører positivt testresultat i en prøve med materiale fra 40 kuld (500 pattegrise), men at halen fra en positiv sogris ikke kunne genfindes i PF fra flere kuld. I Danmark anvendes en anden metode ved udvinding af PF end i USA, og desuden vil PF fra danske grise indeholde rester af bedøvelsesvæske efter kastration, Derfor er der behov for at få undersøgt følsomheden af PCR-test for PRRS-virus på PF under danske forhold, så der kan laves en korrekt vejledning i forhold til, hvor mange kuld der kan samles i hver pose ved indsamling af materiale til PF. Der undersøges både haler og testikler for at teste følsomheden under danske forhold for både sogrise og hangrise.

Følsomheden blev undersøgt ved optøning af testikler eller haler fra enkelte PRRS-positive grise sammen med testikler og haler fra i alt 20 PRRS-negative kuld, fordi samling af materiale fra 20 kuld til én PCR-test er det, der anbefales i Danmark. Haler og testikler fra PRRS-negative pattegrise blev indsamlet gennem en periode af personalet i en besætning med kendt PRRS-negativ status, og haler og

testikler fra PRRS-positive pattegrise blev udvalgt ud fra et panel af enkeltfrosne haler og testikelpar fra PRRS-positive besætninger. Forekomsten af PRRS-virus i de grise, som haler og testikler var indsamlet fra, blev undersøgt med en PCR-test på en blodprøve fra de samme grise. Der blev udvalgt 40 prøver i alt: Fem haler fra stærkt positive sogrise og 35 sæt testikler fra moderat positive hangrise. Haler og testikler fra PRRS-positive grise blev taget direkte fra fryseren og placeret i en pose med frosne testikler og haler fra 20 kuld grise fra den negative besætning, så der var materiale fra én positiv gris (hale eller testikler) i samme pose som haler og testikler fra 20 PRRS-negative kuld. Herefter blev materialet optøet sammen for at efterligne det, der vil ske, hvis der er en enkelt PRRS-positiv gris i en pose med materiale fra 20 kuld.

Ud af de 35 portioner PF med et sæt positive testikler i var der 10 portioner (29%), der var positive for PRRS-virus ved PCR-test, men de øvrige portioner gav et falsk negativt testsvar. Der kunne ikke ses nogen sammenhæng mellem, om den samlede PF-prøve var positiv i forhold til, hvor meget virus der var fundet i den positive gris. Selv med de stærkt positive haler lykkedes det kun at få et positivt testresultat i én ud af de fem PCR-tests på PF fra 20 kuld, hvilket understøtter konklusionen fra de amerikanske undersøgelser. I praksis betyder resultaterne, at det ikke kan anbefales at samle materiale fra mere end 20 kuld til fremstilling af PF men også, at det bør overvejes at samle færre kuld i hver pose, når forekomsten af PRRS-virus blandt grisene forventes at være lav. Desuden understreger dette studie vigtigheden af, at en periode med indsamling af PF i forbindelse med en sanering altid skal efterfølges af en periode, hvor der tages prøver fra fravænningsgrise. PRRS-positive sogrise, som kun bidrager med haler, kan ikke forventes at medføre et positivt testsvar for PF.

Baggrund

I forbindelse med sanering af sobesætninger for PRRS er det vigtigt at overvåge om og hvor i besætningen, der findes PRRS-virus. PCR-test af testikler og haler (processing fluid, PF) indsamlet ved kastration og halekupering af pattegrise er hyppigt anvendt som en simpel metode til at overvåge PRRS-virus i farestalden. Analyse af PF er kendt fra udlandet, hvor man har fundet god overensstemmelse mellem fund af PRRS-virus ved analyse af blodprøver og PF fra de samme grupper af dyr, ex. [1, 2]. Materialet, som indgår ved indsamling af PF, består af testikler fra kastrerede hangrise og haler fra både sogrise og hangrise. Analysen for PRRS-virus foretages på den væske, der løber fra haler og testikler efter optøning. Halerne bidrager ikke med meget væske, men tages med, for at man får mulighed for også at finde positive sogrise. Fordelene ved at anvende PF til overvågning for PRRS-virus er især, at der ikke skal tages blodprøver, og at man kan teste materiale fra mange dyr på en gang og øge sandsynligheden for at finde de PRRS-positive dyr.

I besætninger, hvor der kun er ganske få positive dyr, er der dog en risiko for, at man ved sammenblanding af materiale fra mange dyr kan fortynde væsken fra eventuelle positive dyr så meget, at testen giver negativt resultat, selvom der indgår grise med PRRS-virus i prøven. Amerikanske forskere har undersøgt, hvor mange grise der kan samles i den samme prøve, uden at testresultatet bliver negativt pga. fortyndingseffekten, hvis der kun er få virus-positive grise i besætningen. Ved brug af fortyndingsrækker i laboratoriet er det estimeret, at sandsynligheden for et positivt testsvar med én positiv gris i den samlede prøve er hhv. 95%, 80% og 43%, når prøven fra den positive gris (testikler) er blandet sammen med testikler fra hhv. 323, 492 eller 784 grise uden PRRS-virus, så i denne undersøgelse blev der altså fundet en vis fortyndingseffekt [3]. En amerikansk gruppe forskere [4] har undersøgt følsomheden ved en mere praksisnær metode, hvor de blandede enten halen fra én PRRS-positiv sogris eller testiklerne fra én PRRS-positiv hangris sammen med haler og testikler fra hhv. 10, 20, 30, 40 og 50 kuld grise fra en PRRS-negativ besætning og lod væsken dryppe fra gennem et klæde, hvorefter de analyserede væsken med PCR for PRRS-virus. Konklusionen var, at halen fra en enkelt PRRS-positiv sogris ikke er nok til at give et positivt testsvar, når den blandes sammen med bare 10 negative kuld, men at testikelvæsken fra en positiv hangris er nok til at give et positivt testsvar, selv når den blev blandet med materiale fra 40 kuld PRRS-negative grise, svarerende til omkring 500 pattegrise.

I Danmark indsamles PF ikke ved afdrypning, men ved en metode, hvor testikler og haler samles i en pose og fryses efter udtagning, og hvor analysen så foretages på den væske, som drypper fra det frosne materiale ved optøning [5] (se også appendix). Desuden vil testikelvævet under danske forhold kunne indeholde rester af bedøvelsesvæske (Procamidol® eller Pronestestic®). Begge dele vil kunne påvirke metodens følsomhed i forhold til det, der er påvist i den amerikanske undersøgelse, så derfor er der behov for at få undersøgt følsomheden af PCR-test for PRRS-virus på PF under danske forhold, så der kan laves en korrekt vejledning i forhold til, hvor mange kuld der kan samles i hver pose ved indsamling af materiale til PF. Der undersøges både haler og testikler for at teste følsomheden under danske forhold for både sogrise og hangrise.

Materialer og metoder

Følsomheden blev undersøgt ved optøning af testikler eller haler fra enkelte PRRS-positive grise sammen med testikler og haler fra i alt 20 PRRS-negative kuld, fordi samling af materiale fra 20 kuld til én PCR-test er det, der anbefales i Danmark [5].

Indsamling af materiale til PF

Haler og testikler fra PRRS-negative pattegrise blev indsamlet gennem en periode af personalet i en besætning med kendt PRRS-negativ status. Indsamlet materiale blev fordelt i poser á 20 kuld, svarende til omkring 300 grise. Materialet blev frosset ned og sendt i frossen tilstand til laboratorium for

Svinesygdomme, Kjellerup. Besætningens negative status blev bekræftet ved PCR-test, før projektet blev igangsat.

Haler og testikler fra PRRS-positive pattegrise blev udvalgt ud fra et panel af enkeltfrosne haler og testikelpar fra uvaccinerede, PRRS-positive besætninger. Forekomsten af PRRS-virus i de grise, som haler og testikler var indsamlet fra, blev undersøgt med en PCR-test på en blodprøve fra de samme grise. Der blev udvalgt 40 prøver i alt: Fem haler fra stærkt positive sogrise og 35 sæt testikler fra moderat positive hangrise. Halerne stammede fra en besætning, som var positiv for PRRS1, og testiklerne fra en besætning, som var positiv for PRRS2. Det antages ikke, at der er forskel på PCR-testens følsomhed i forhold til, om der er tale om PRRS1 eller PRRS2.

Analyse af PF fra 20 kuld

Haler og testikler fra PRRS-positive grise blev taget direkte fra fryseren og placeret i en pose med frosne testikler og haler fra 20 kuld grise fra den negative besætning, så der var materiale fra én positiv gris (hale eller testikler) i samme pose som haler og testikler fra 20 PRRS-negative kuld. Herefter blev materialet optøet sammen for at efterligne det, der vil ske, hvis der er en enkelt PRRS-positiv gris i en pose med materiale fra 20 kuld. PCR-test blev udført på opsamlet væske efter optøning af de 20 kuld plus materiale fra én PRRS-positiv gris.

Resultater og diskussion

Panel af positive haler og testikler

Tabel 1 viser Cp-værdien for blodprøver fra de PRRS-positive grise, som har leveret hhv. haler og testikler til undersøgelsen. PCR-testen for PRRS-virus har ikke nogen tærskelværdi, men positive prøver ligger med Cp-værdi mellem 5 og 28 ved PCR-test på Veterinært Laboratorium, Kjellerup. Cp er det måleenhed, som positive PCR-undersøgelser afrapporteres med, og Cp værdierne kan bruges som et indirekte mål for mængden af virus i prøven; jo lavere Cp værdien er, jo mere virus er der i prøven og omvendt. Cp-værdier over 25 anses som værende svagt positive for PRRS-virus og kan på enkeltdyrsniveau tyde på enten en begyndende eller aftagende viræmi. Der er udvalgt haler fra grise med stærkt positive blodprøver (Cp-værdier under 15), fordi man som nævnt normalt ikke forventer en positiv PCR på PF, der kun indeholder en enkelt positiv hale – dvs. kun haler fra grise med rigtig meget virus i kroppen forventes at give et positivt testresultat. Testiklerne er udvalgt fra grise, som har moderat positive blodprøvesvar for at afspejle det, der forventes i danske besætninger med lav forekomst af PRRS-virus.

Tabel 1. PRRS-positive grise valgt til PCR-test med materiale fra 20 PRRS-negative kuld

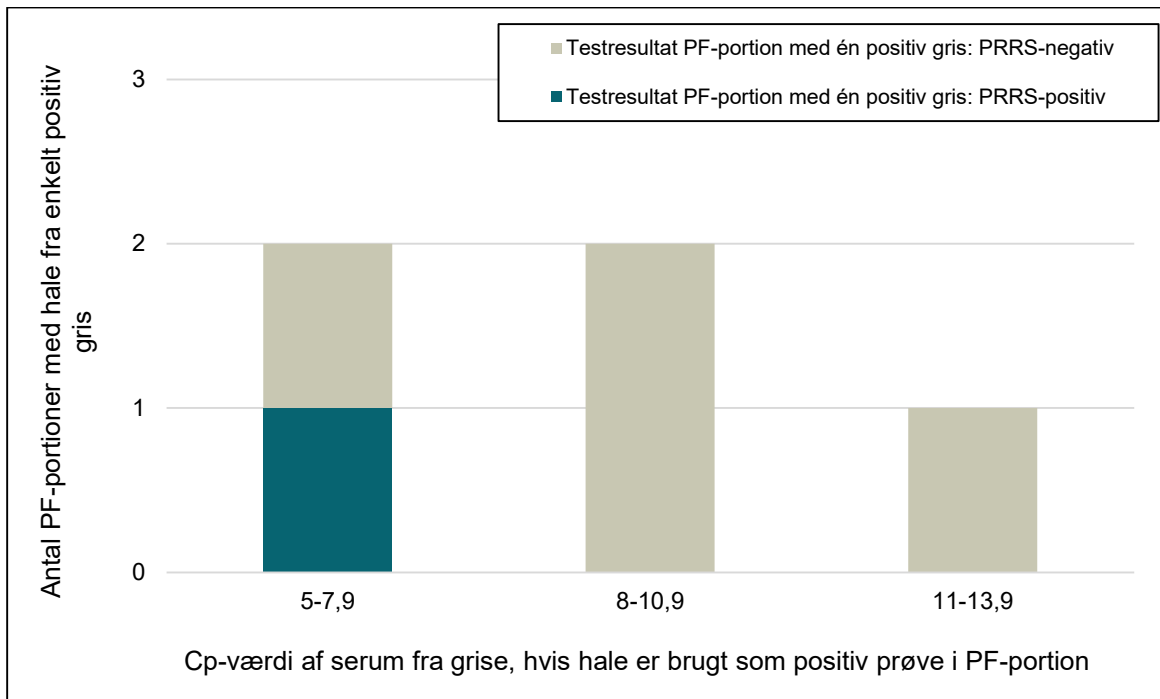
PRRS-type	Grisens køn*	Gris nr.	Cp blodprøve
PRRS1	S	S1	5
	S	S2	7,63
	S	S3	9,68
	S	S4	10,55
	S	S5	13,91
PRRS2	H	H1	15,16
	H	H2	16,46
	H	H3	16,64
	H	H4	17,68
	H	H5	17,85
	H	H6	17,89
	H	H7	18,06
	H	H8	18,33
	H	H9	18,56

H	H10	18,71
H	H11	18,94
H	H12	18,97
H	H13	19,21
H	H14	19,24
H	H15	19,62
H	H16	19,69
H	H17	20,75
H	H18	21,01
H	H19	21,88
H	H20	21,89
H	H21	21,90
H	H22	21,95
H	H23	22,09
H	H24	22,30
H	H25	22,80
H	H26	22,89
H	H27	23,01
H	H28	23,19
H	H29	23,49
H	H30	23,83
H	H31	24,22
H	H32	24,43
H	H33	24,82
H	H34	24,91
H	H35	25,04

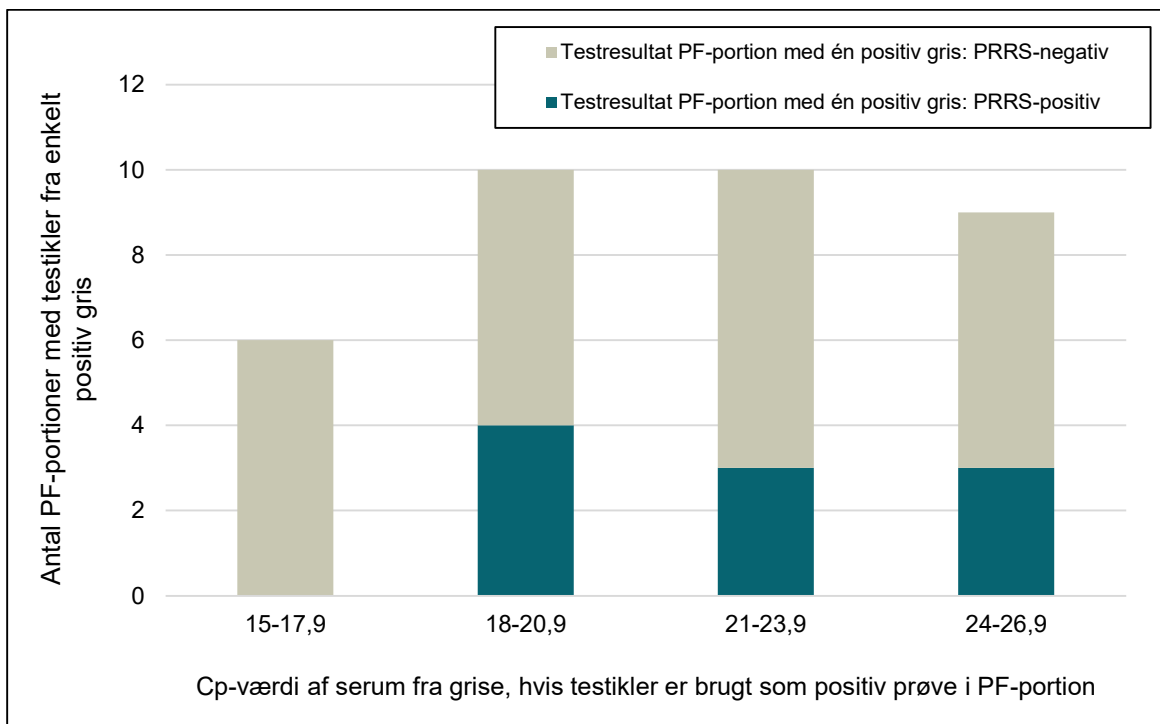
*S: Sogris; H: Hangris

PCR-test af PF fra 20 negative kuld plus én positiv pattegris

Resultatet af PCR-test på 20 PRRS-negative kuld sammen med materiale fra én PRRS-positiv gris ses i figur 1 (haler) og figur 2 (testikler). Selvfølgelig med de stærkt PRRS-positive haler lykkedes det kun at få et positivt testresultat i én ud af de fem PCR-tests på PF fra 20 kuld, hvilket understøtter konklusionen fra de tidligere undersøgelser [4]. Man skal ikke forvente at få et positivt testsvar ud fra halen fra en PRRS-positiv gris. Ud af de 35 portioner PF med et sæt positive testikler i var der 10 portioner (29%), der var positive for PRRS-virus ved PCR-test, men de øvrige portioner gav et falsk negativt testsvar. Der kunne ikke ses nogen sammenhæng mellem, om den samlede PF-prøve var positiv i forhold til, hvor meget virus der var fundet i den positive gris (Cp-værdi på blodprøve), så i det interval af positive Cp-værdier på blodprøver, der er undersøgt i indeværende studie, er der tilsyneladende samme sandsynlighed for positiv PCR på PF fra 20 kuld.



Figur 1: Testresultat ved analyse af processing fluid (PF) fra 20 PRRS-negative kuld tilsat halen fra en enkelt positiv sogris (lav Cp = Meget virus målt i serum fra den positive gris)



Figur 2. Testresultat ved analyse af processing fluid (PF) fra 20 PRRS-negative kuld tilsat testiklerne fra en enkelt positiv hangris (lav Cp = Meget virus målt i serum fra den positive gris)

Diskussion

Undersøgelsen bekræfter, at haler ikke udgør et godt materiale til genfindning af PRRS-virus i PF. For testikler viser denne undersøgelse lavere følsomhed af PCR-test på PF i forhold til tidligere undersøgelser [4], når der kun er materiale fra en enkelt positiv gris i prøven. Kun 29% af de 35 portioner PF havde et positivt testsvar, selvom prøven indeholdt materiale fra en moderat positiv hangris. Det vides

ikke, om det er den ændrede metode (frysning i stedet for afdrypning), en fortyndingseffekt fra bedøvelsesmidlerne eller en kombination af de to faktorer, der giver den lavere følsomhed.

I praksis betyder det, at det ikke kan anbefales at samle materiale fra mere end 20 kuld til fremstilling af PF men også, at det bør overvejes at samle færre kuld i hver pose, når forekomsten af PRRS-virus blandt grisene forventes at være lav. Desuden understreger det vigtigheden af, at en periode med indsamling af PF i forbindelse med en sanering altid skal efterfølges af en periode, hvor der tages prøver fra fravænningsgrise, som det er beskrevet i de danske anbefalinger for overvågning i forbindelse med sanering for PRRS (6).

Sidst i en saneringsperiode med forventet lav forekomst af PRRS-virus, bør antal kuld pr. pose med PF nedsættes til ex. 10 kuld pr. pose

Konklusion

Denne undersøgelse viste, at kun knap 1/3 af PCR-tests på 20 kuld vil have positivt svar, hvis der kun er testikler fra en enkelt moderat PRRS-positiv hangris i posen, og at der ikke kan forventes positiv PCR for PF fra 20 kuld, hvis det eneste PRRS-positive materiale i prøven er en hale. Derfor anbefales færre kuld pr. pose, når man er sidst i saneringsforløbet, samt at perioden med indsamling af PF altid efterfølges af en periode med test af fravænningsgrise.

Undersøgelsen er godkendt af dyreforsøgstilsynet med journalnummer 2024-15-0201-01656.

Referencer

- [1] Lopez WA, Angulo J, Zimmermann JJ and Linhares DC (2018). PRRS monitoring in breeding herds using processing fluids. *Journal of Swine Health and Production*, May and June 2018, 146-150.
- [2] Trevisan G, Jablonski E, Angulo J, Lopez WA and Linhares DC (2019). Use of processing fluid samples for longitudinal monitoring of PRRS virus in herds undergoing virus elimination. *Porcine Health Management* (2019) 5:18.
- [3] Lopez WA, Gauger PC, Harmon KM, Holtkamp DJ, Cano JP, Macedo N, Zhang M, Silva GS, Angulo J, Zimmerman JJ and Linhares DC (2021). Probability of PRRS virus detection in pooled processing fluid samples. *Vet Mic* 261 (2021) 109190.
- [4] Vilalta C, Baker J, Sanhueza J, Murray D, Sponheim A, Alvarez J, Sylvia F, Polson D, Torremorell M, Corzo C and Morrison R (2019). Effect of litter aggregation and pooling on detection of PRRSV in piglet processing fluids. *J Vet Diagn Invest* vol. 31(4) 625-628.
- [5] Vejledning til indsamling af PF. *Fra* https://svineproduktion.dk/Aktuelt/Nyheder/2024/03/070324_PRRS_proever
- [6] Weber N, Nielsen EO, Bak H, Lorenzen B, Fertner M, Hvolgaard AGH og Larsen LE (2023). Anbefalinger for PRRS klassifikation, stabilisering og overvågning af sohold i forbindelse med delsanering. *Fra* https://svineproduktion.dk/aktuelt/temaer/~/link.aspx?_id=E6FEF2645D4942559CBE3E8076A78B9C&_z=z

Dyregruppe: Gris

Fagområde: Veterinær- & Kvalitetsforhold

Appendix

Vejledning om indsamling af materiale til processing fluid til PCR-test for PRRS-virus
(tilgængelig på https://svineproduktion.dk/Aktuelt/Nyheder/2024/03/070324_PRRS_proevev)

Processing Fluid (PF) fra testikler og haler

Vejledning til opsamling, opbevaring og forsendelse af PF-prøver til PCR for PRRS-virus

Version 1.1 – 2024



Max
20 kuld

Opsamling af testikler og haler

Ved kastration og halekupering opsamles testikler og haler i en plasticpose

Maksimalt testikler og haler fra 20 kuld i en pose



Frost
-20°C

Opbevaring

Det er vigtigt at lægge posen på frost så hurtigt som muligt efter opsamlingen

* Pose med frosne testikler og haler kan sendes til L&F Veterinært Laboratorium, Kjellerup uden optøning



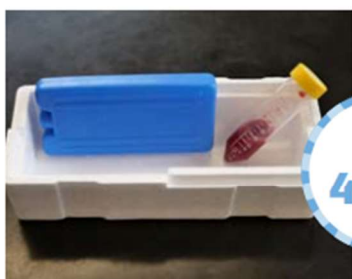
Min
2 ml

Køl
4-8°C

Alternativt overfør PF-prøver til rør:

Tø posen op i køleskab
Klip et lille hul i posen
PF-prøven aftappes i en beholder med skruelåg

Sørg for, at der minimum er 2 ml PF-prøve i røret



Køl
4-8°C

Afsendelse af PF-prøver

PF-prøven emballeres godt sammen med køleelementer og sendes samme dag

Husk at skrive PF-prøve på indsendelsesblanketten
Sendes til L&F Veterinært Laboratorium, Kjellerup eller SSI

*L&F Veterinært Laboratorium, Kjellerup kan modtage frosne testikler/haler til aftapning af væske.
SSI modtager ikke hele testikler/haler, men kun den aftappede PF væske.

STØTTET AF
Svineafgiftsfonden

KØBENHAVNS
UNIVERSITET

STATENS
SERUM
INSTITUT



SEGES
INNOVATION