

KVANTITATIV PCR KAN VÆRE ET GODT SUPPLEMENT TIL PÅVISNING AF CYTOMEGALOVIRUS-INFEKTION

MEDDELELSE NR.1162

Næsesvaberprøver undersøgt ved kvantitativ PCR er værdifulde i forhold til diagnostik af Porcint Cytomegalovirus-infektion på levende smågrise og kan i vid udtrækning erstatte histologi af næseslimhinde fra obducerede dyr.

INSTITUTION: SEGES SVINEPRODUKTION, DEN RULLENDE AFPRØVNING
FORFATTER: LOLA TOLSTRUP, SVEND HAUGEGAARD, LARS ERIK LARSEN*, CHARLOTTE
KRISTIANE HJULSAGER*, TIM KÅRE JENSEN*, METTE SIF HANSEN*, CHARLOTTE
SONNE KRISTENSEN

*DTU Veterinærinstituttet

UDGIVET: 4. FEBRUAR 2019

Dyregruppe: Svin

Fagområde: Sundhed, veterinær

Sammendrag

Undersøgelse på levende grise kan erstatte omkostningstung histologi fra næseslimhinden når Cytomegalovirus skal påvises. Metoden er en Real-time kvantitativ PCR (qPCR) på næsesvaberprøver til rutinemæssige diagnostik af PCMV-infektion

Porcint Cytomegalovirus (PCMV) er et virus, der giver infektion i næseslimhinden og bliver ofte betegnet 'snotsyge'. Virusset har været kendt siden midten af forrige århundrede, og den er vidt udbredt, både mellem og inden for besætninger.

Der findes ingen behandling eller vaccine mod PCMV, hvorfor den eneste måde at undgå virusset på er ved at undgå smitte, f.eks. ved at sikre overførsel af antistoffer til pattegrisene via råmælk. Den økonomiske betydning af PCMV er usikker, men det vides, at virusset kan forværre symptomerne fra andre sygdomme, f.eks. influenza.

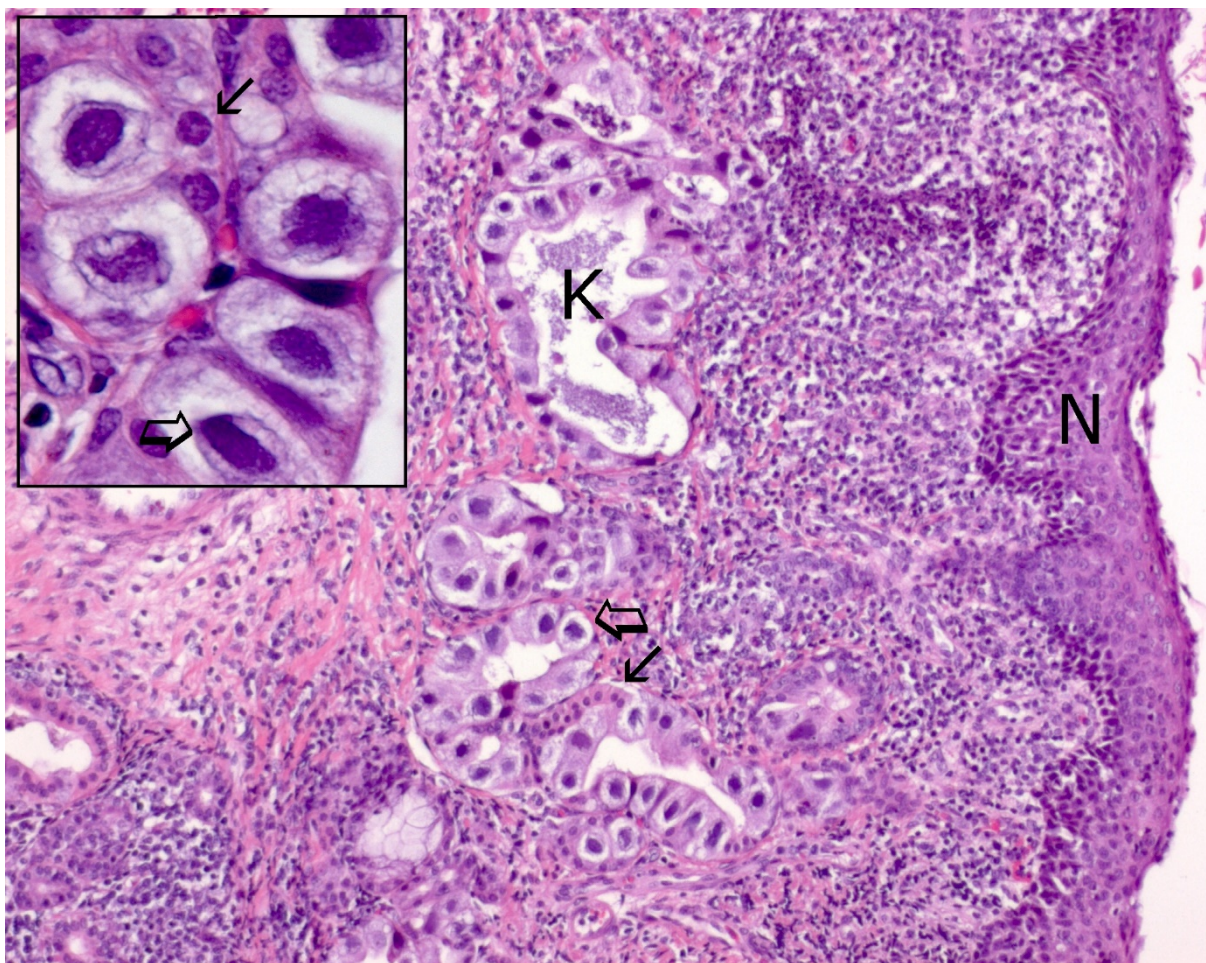
PCMV-infektioner er traditionelt set blevet diagnosticeret ved histologi af vævet i næseslimhinden, hvor det er muligt at observere virus inde i næseslimhindens celler hos et smittet dyr. Histologisk diagnostik kan kun udføres på døde dyr, og derfor har PCR på slim fra næsesvaber været brugt som en alternativ metode til at diagnosticere PCMV på levende dyr. Hvorvidt denne metode er sammenlignelig med histologi, har indtil nu været uvist.

På baggrund af ovenstående har dette studie undersøgt sammenhængen mellem histologi og qPCR til diagnostik af PCMV på 46 grise mistænkt for PCMV. Det var muligt at konkludere, at der er god sammenhæng mellem de to metoder, hvis der benyttes et cut-off på mellem $5,83\log_{10}$ og $7,16\log_{10}$ viruskopier pr. ml på den kvantitative PCR.

Baggrund

Porcint Cytomegalovirus (PCMV) har været kendt siden 1955, hvor det blev påvist i forbindelse med rhinitis (infektion i næseslimhinden). Virusset er vidt udbredt blandt svin i alle svineproducerende lande, og infektion med PCMV bliver også betegnet 'snotsyge'. Det formodes at forekomme i en stor del af danske svinebesætninger, og prævalensen er høj inden for besætningen – specielt i klimastalden [1] [2]. PCMV er et herpesvirus, der i grisen kan danne en livslang latent infektion, der blusser op ved stress mm. Der findes ingen behandling eller forebyggelse til svin, hvorfor eneste kontrolmetode er at undgå, at grisen bliver smittet. Sygdommen kaldes også 'inklusionslegemerhinitis' på grund af ophobning af virus inde i kernen af grisens celler, de såkaldte intranukleære inklusionslegemer¹ (Figur 1).

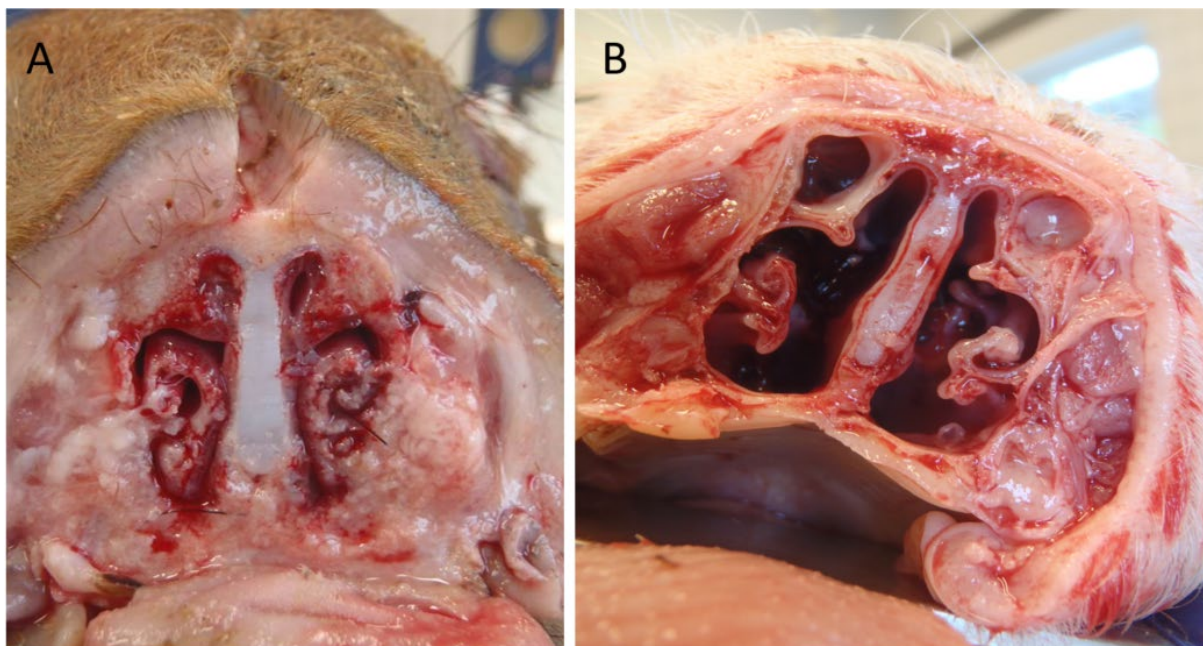
¹ Intranukleære inklusionslegemer er betegnelsen for cellekerner udfyldt af virus.



Figur 1. Histologisk billede af næseslimhinde (N) fra svin med inklusionslegeme rhinitis (PCMV infektion). I slimhinden ses kirtler (K) med PCMV inficerede epithel celler (bred pil) med virus inklusions legeme i cellekernen og normale epithel celler (smal pil). Foto: DTU Veterinærinstituttet.

Soen er beskyttet af antistoffer, hvis den tidligere har mødt virus, og pattegrisene beskyttes via maternelle antistoffer. Dog er beskyttelsen ikke total og kan således gennembrydes ved massivt smittepres. Virus kan overføres til grisefostrene via børen, hvilket kan medføre fosterdød. Hvis grisene fødes med smitten, er de små og utrivelige med forekomst af inklusionslegemer i de fleste organer og dør ofte inden for 14 dage. Smitte kan også ske via fødselskanalen eller gennem soens mælk de første par uger efter faring [1].

Sygdommen er traditionelt set blevet diagnosticeret ved at se på vævssnit fra næseslimhinden, som studeres under mikroskop (kaldet histologi). Sygdomstegn er intranukleære inklusionslegemer i slimhindens celler samt inficerede, døde celler og vævsdød af slimhinden. Endvidere ses ødelæggelse af knoglevævet som ved nysesygge – også selvom der ikke er et bakterielt angreb [2] (Figur 2).



Figur 2. Foto af tværsnit af tryner med mulig PCMV-infektion. A viser næseflåd i næsehulen (mucopurulent rhinitis). B viser ødelæggelse af knoglevæv (conchae atrofi).
Foto: Laboratorium for Svinesygdomme.

PCMV er som regel udbredt i hele næseslimhinden, men inklusionslegemerne kan formentlig kun påvises i en kortere periode, hvorefter sygdomsbilledet overtages af uspecifikke luftvejsforandringer. Tilstedeværelse af virusset på slimhinderne giver ikke nødvendigvis anledning til sygdomstegn, hvorfor påvisning af virusset ved f.eks. klassisk PCR på slim fra en næsesvaber ikke som udgangspunkt siger noget om, at PCMV er årsagen til sygdomstegnene, da det ikke vides, om virus er inde i cellerne. Metoden med næsesvab er dog vidt udbredt i Danmark, da den er billigere end histologi og kan laves på levende grise. Der er dog ingen sikkerhed for, om påvisning af virus med klassisk PCR kan bruges til at dokumentere, at virusset giver patologiske forandringer.

I 1970'erne blev infektioner med PCMV ikke tillagt større betydning. Dog er der i Danmark i de seneste år set besætninger, hvor PCMV-infektion kan have været en medspiller eller direkte årsag til luftvejslidelser og utrivelighed blandt klimagrise [2] [3]. Dette har medført en fornyet interesse for sygdommen og et behov for nemmere og billigere metoder til diagnostik af PCMV. Den økonomiske betydning af Cytomegalovirus er ukendt.

Formålet med dette projekt var derfor at skabe klarhed over den diagnostiske værdi af påvisning og kvantificering af PCMV i næsesvabere. Dette blev gjort ved at sammenligne fund af PCMV med en kvantitativ PCR på næsesvabere med histologiske fund af PCMV-infektion som inklusionslegemer i næseslimhindens celler. Denne qPCR har ikke tidligere været brugt til dette formål.

Materiale og metode

Undersøgelsens prøver blev indsamlet på SEGES Laboratorium for Svinesygdomme.

Indsendelserne var hele klimagrise eller hoveder herfra, hvor der var indikation for at undersøge for PCMV – dvs. respirationsvejssymptomer i besætningen som hoste eller nysen. Prøverne blev parvist udtaget på følgende måde: En svaberprøve fra næseslimhinden blev udtaget og opbevaret i lidt pepton buffer, hvorefter et stykke af trynen blev skåret af og lagt i formalin. De to prøver fra hver gris blev nummereret ens og opbevaret i hver sin beholder. Næsesvaberne blev opbevaret på frost (-80 °C). Prøverne blev undersøgt på DTU Veterinærinstituttet (DTU Vet). Næsesvaberne blev undersøgt for PCMV ved real-time kvantitativ PCR (q-PCR). Til histologi blev trynestykket (med næseslimhinde) afkalket, skåret i 3-5 µm, farvet med hematoxylin og eosin og undersøgt ved lysmikroskopi for tilstedeværelse af intranukleære inklusionslegemer.

Testresultaterne fra q-PCR blev afrapporteret som antal viruskopier pr. ml. De histologiske fund i næseslimhinden blev kategoriseret som følgende: 'ingen tegn på PCMV infektion', 'ikke fyldestgørende tegn på PCMV infektion (ingen inklusionslegemer observeret)' eller 'sikre tegn på PCMV infektion (inklusionslegemer observeret)'.

Efterfølgende blev resultaterne fra de to diagnostiske metoder sammenlignet ved udregning af det optimale cut-off for antal viruskopier samt sensitivitet og specificitet (Figur 3). Her blev histologi valgt som 'gold standard', dvs. den test, som antageligt bedst indikerer, om dyret er sygt eller raskt.

Sensitivitet (Se)	Specificitet (Sp)
•Hvor sandsynligt er det, at PCMV kopier i næsesvaber identificerer de dyr, der er positive ved histologi.	•Hvor sandsynligt er det, at PCMV kopier i næsesvaber identificerer de dyr, der er negative ved histologi.

Figur 3. Beskrivelse af de brugte testevalueringsparametre.

For at finde den rette cut-off for antal viruskopier i qPCR testen, der kan skelne mellem infektionen påvist ved histologi på næseslimhinden og ingen påvisning af infektion, blev der lavet en ROC-analyse. En ROC-kurve viser, hvor valid testen er (qPCR) sammenlignet med en reference/Gold standard-test (histologi). Jo højere kurve, des bedre test. Dette måles ved at bestemme arealet, der ligger under kurven (AUC). En AUC på 1 betyder en perfekt overensstemmelse med Gold standard-testen, og 0,5 betyder, at testen ikke er bedre end gætværk.

Derudover blev det optimale cut-off for PCR udregnet ved at sammenligne mange forskellige antal viruskopier med de fund, der blev set ved histologi. Således blev det antal viruskopier, der giver den bedste kombination af høj sensitivitet og høj specificitet, fundet. Dette fortæller, hvornår testen bliver mest nøjagtig i forhold til Gold standard-histologi.

Hvornår dyret var sygt vurderet ved histologi, blev opdelt i to kriterier, og ROC-kurver blev lavet for begge:

- Kriterie 1: grisen er syg, når der ved histologi ses enten ikke fyldestgørende eller sikre tegn på PCMV-infektion
- Kriterie 2: grisen er syg, når der ved histologi ses sikre tegn på PCMV-infektion

Resultater og diskussion

Der blev i alt taget prøver fra 46 grise i perioden januar til oktober 2018. Resultaterne fra de PCR og de histologiske undersøgelser ses i Tabel 1. Da prøverne i dette forsøg var udtaget på grise, som var mistænkt for at have PMCV, siger dette ikke noget om den generelle prævalens af PCMV i danske grise.

Tabel 1. Resultater fra PCR og histologiske undersøgelser.

	Antal grise
Virus isoleret i næsesvaber	36 (78 %)
Histologisk fund:	
Ingen tegn på PCMV	9 (20 %)
Tvivlsomme tegn på PCMV	18 (39 %)
Sikre tegn på PCMV (inklusionslegemer)	19 (41 %)

Hvis både ikke fyldestgørende tegn og sikre tegn på PCMV-infektion blev betragtet som positiv (kriterie 1), blev AUC udregnet til 0,83. I scenariet (kriterie 2), hvor kun sikre tegn på PCMV-infektion i histologi blev betragtet som positiv, blev AUC udregnet til 0,96. Dette betyder, at der var en god overensstemmelse mellem fund i qPCR og ved histologi. Den bedste korrelation mellem qPCR og histologi sås, når kun de sikre tegn på PCMV-infektion skulle findes. ROC-kurver for henholdsvis kriterie 1 og kriterie 2 er vist i Appendiks 1.

Cut-off for antal virus-kopier pr. ml blev for kriterie 1 beregnet til $5,83 \log_{10}$, hvilket resulterer i en sensitivitet på 0,70 [0,53;0,84]² og en specificitet på 0,89 [0,52;1,00]. Den samme beregning for kriterie 2 giver et cut-off på $7,16 \log_{10}$ viruskopier pr. ml., en sensitivitet på 0,89 [0,67;0,99] og en specificitet på 0,96 [0,81;1,00]. Begge vurderinger af cut-off er afbilledet grafisk i Figur 4 og Figur 5. Det er derfor muligt at benytte tommelfingerreglen om, at har man over $6 \log_{10}$ virus-kopier pr. ml på næsesvaber, vil man med stor sandsynlighed også finde sikre tegn på PCMV-infektion i næseslimhindens celler ved en histologisk undersøgelse. Dog skal det nævnes, at cut-off er

² [] angiver 95 % konfidensinterval.

bestemt ud fra den specifikke PCR-test, som bruges af DTU Vet, og at den ikke kan forventes at være den samme for PCMV PCR på andre diagnostiske laboratorier, med mindre der er udført en kalibrering overfor DTU Vets test.

Resultaterne fra dette projekt viste, at der er en god sammenhæng mellem mængden af PCMV bestemt ved qPCR og forekomst af inklusionslegemer ved histologi. qPCR er således et godt supplement til histologi i den rutinemæssige diagnostik af Cytomegalovirus-infektion hos grise. Det kan for eksempel bruges som screeningsværktøj på poolede prøver og derefter opfølges med enkeltprøver på qPCR eller histologi.

Konklusion

Real-time kvantitativ PCR på næsesvaberprøver kan i den rutinemæssige diagnostik af PCMV-infektion supplere den tidligere anvendte histologi, hvis der benyttes et cut-off på enten $5,83\log_{10}$ eller $7,16\log_{10}$ viruskopier pr. ml, afhængigt af sikkerheden for infektion. Cut-off knytter sig specifikt til undersøgelsens anvendte PCR.

Referencer

- [1] T. C. Mettenleiter, B. Ehlers, T. Müller, K.-J. Yoon og J. P. Teifke, »Herpesviruses,« i *Diseases of Swine*, 10. red., Wiley-Blackwell.
- [2] DTU Veterinærinstituttet, »Årsrapport 2017, Laboratorieundersøgelser af materiale fra SVIN på DTU Veterinærinstituttet og SEGES Laboratoriet i Kjellerup,« DTU Veterinærinstituttet, 2018.
- [3] G. B. Nielsen og S. L. Musse, »Kortlægning af årsager til øvre luftvejsinfektion blandt pattegrise i en sønderjysk sobesætning samt beskrivelse af infektionsforløbet ved infektion med PCMV,« 2014.

Deltagere

Statistikker:

Mai Britt Friis Nielsen

Afprøvning nr. 1564
Aktivitetsnr.: 075-1501271

//CSK//



Tlf.: 33 39 45 00

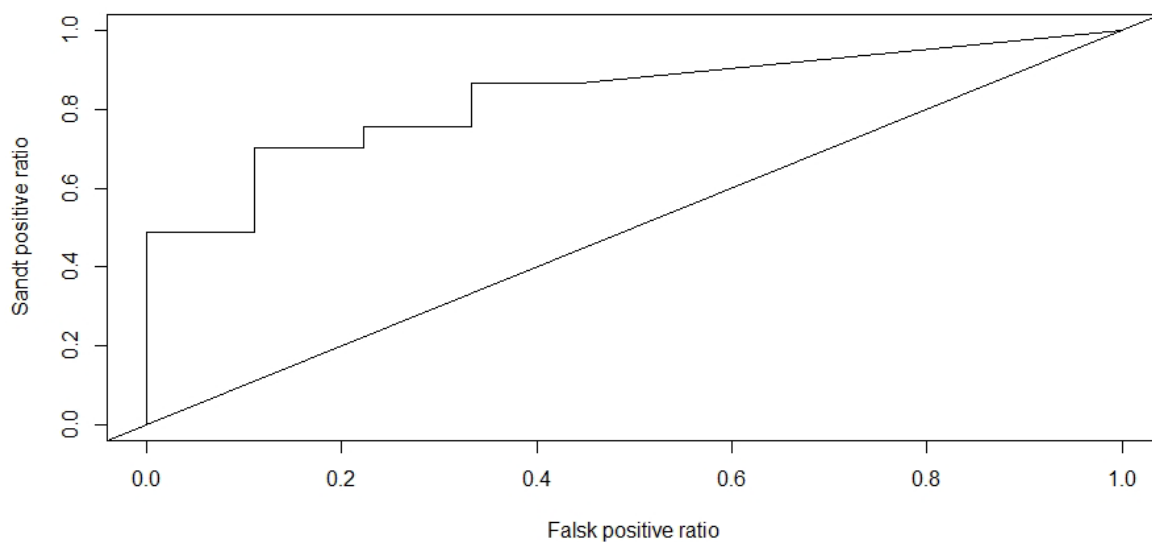
svineproduktion@seges.dk

Ophavsretten tilhører SEGES. Informationerne fra denne hjemmeside må anvendes i anden sammenhæng med kildeangivelse.

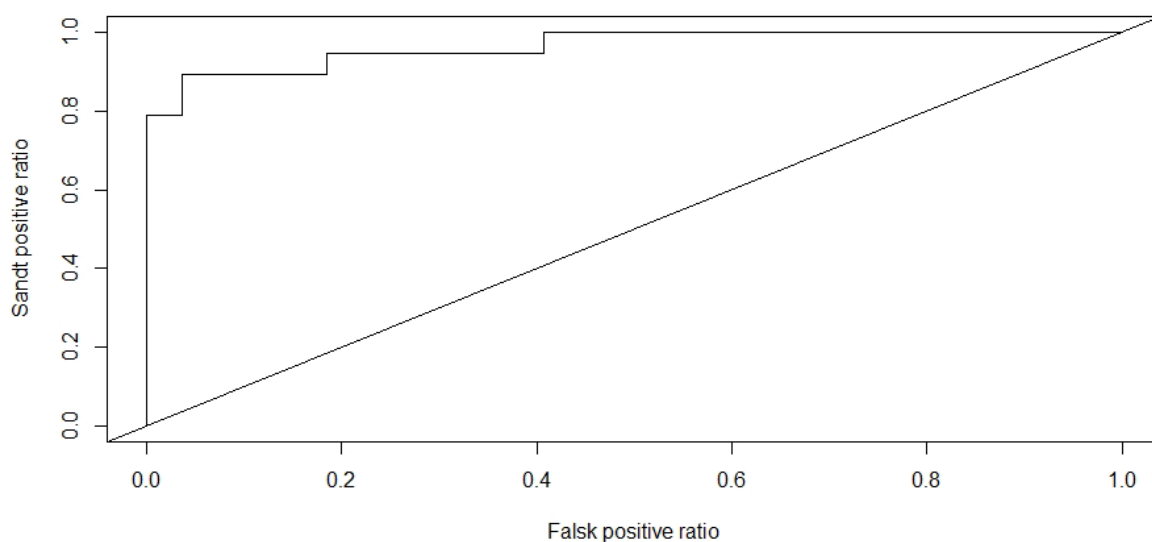
Ansvar: Informationerne på denne side er af generel karakter og søger ikke at løse individuelle eller konkrete rådgivningsbehov.

SEGES er således i intet tilfælde ansvarlig for tab, direkte såvel som indirekte, som brugere måtte lide ved at anvende de indlagte informationer.

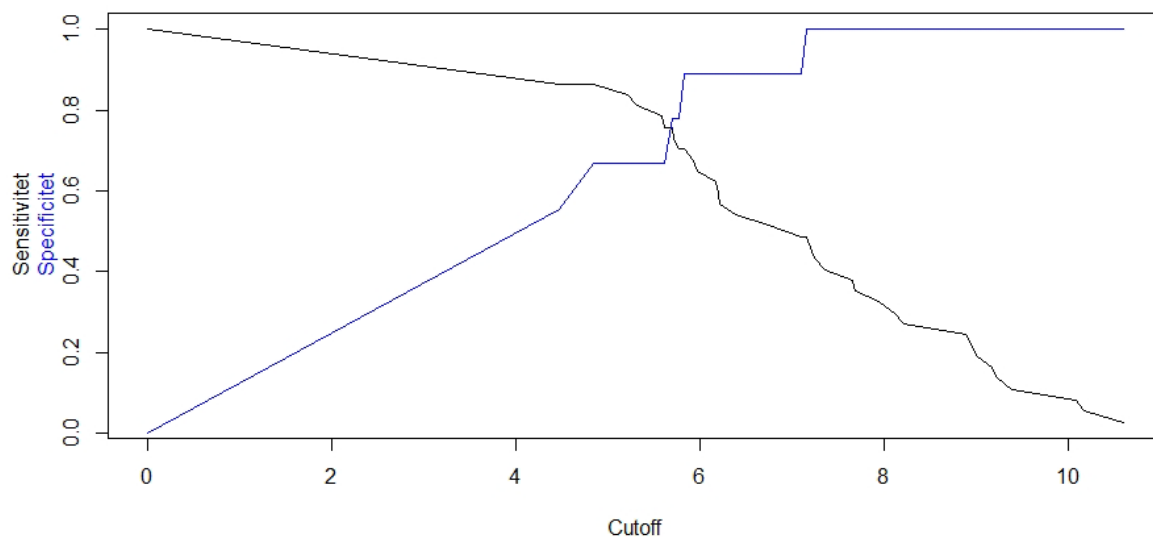
Appendiks 1



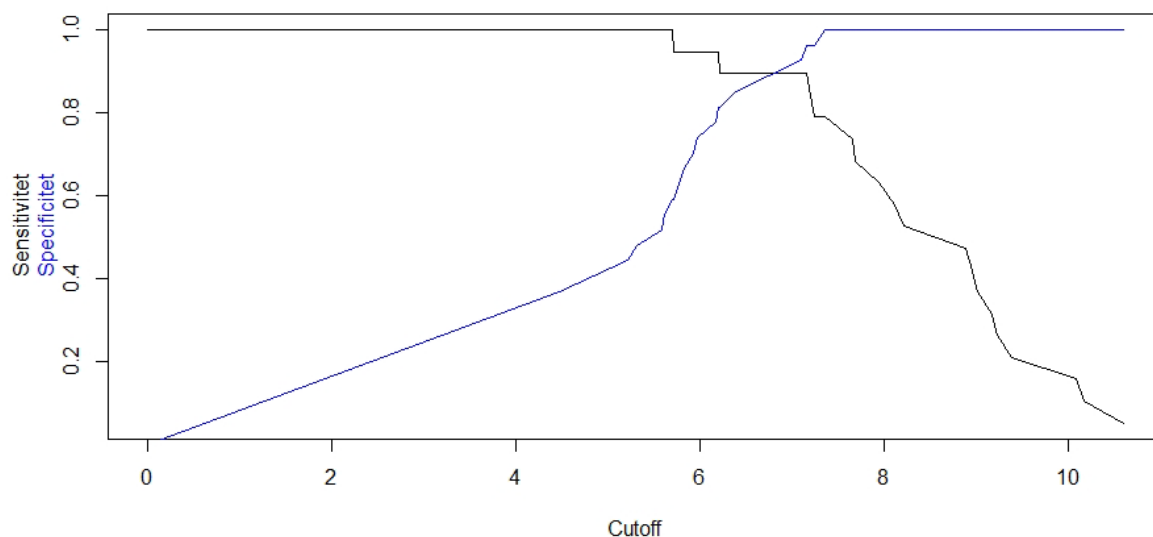
Figur 4: ROC-kurve for kriterie 1 (histologi er positiv ved både tvivlsomme tegn og sikre tegn på PCMV)



Figur 5: ROC-kurve for kriterie 1 (histologi er positiv kun ved sikre tegn på PCMV)



Figur 6: grafisk fremstilling af sensitivitet og specificitet for forskellige cut-off på PCR sammenlignet med histologi kriterie 1 (histologi er positiv ved både tvivlsomme tegn og sikre tegn på PCMV)



Figur 7: grafisk fremstilling af sensitivitet og specificitet for forskellige cut-off på PCR sammenlignet med histologi kriterie 2 (histologi er positiv ved sikre tegn på PCMV)