

ANBEFALINGER FOR UDTAGNING, OPBEVARING OG FORSENDELSE AF PRØVEMATERIALER TIL UNDERSØGELSE FOR PRRSV VED PCR

Elisabeth Okholm Nielsen^a, Lars E. Larsen^b, Lise Kvisgaard^b, Pia Ryt-Hansen^b,
Anne-Grete Hassing-Hvolgaard^c og Charlotte K. Hjulsager^d

a SEGES Innovation P/S, Grisesundhed

b Københavns Universitet, Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab

c Veterinært Laboratorium, L&F

d Statens Seruminstitut

STØTTET AF

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

I de senere år er danske dyrlæger begyndt at anvende prøvematerialer som spytprøver og væske fra haler og testikler (såkaldt processing fluid – PF) til undersøgelse for PRRS-virus (PRRSV) ved PCR-test. SEGES Innovation, Københavns Universitet (KU), Veterinært Laboratorium og Statens Serum Institut (SSI) har udarbejdet disse anbefalinger for, hvorledes denne type prøvematerialer bør udtages, håndteres, opbevares og transporteres til laboratorierne. Anbefalingerne vil blive opdateret, såfremt der kommer nye resultater fra de undersøgelser, der udføres på KU. Notatet er opdateret i marts 2023

Sammendrag

Anbefalingerne beskriver, hvorledes spytprøver og hale/testikel-væske udtages, håndteres, opbevares og transporteres til de diagnostiske laboratorier til undersøgelse for PRRS-virus ved PCR-test.

For spytprøver gælder det, at enzymer i spytet kan nedbryde PRRS-virus specielt ved stuetemperatur. Undersøgelser på Københavns Universitet (KU) har vist, at opbevaring ved stuetemperatur medfører et signifikant tab af følsomhed. Derfor er det vigtigt at lægge prøven på køl så hurtigt som muligt efter udtagelsen.

Ved kastration opsamles testikler og haler i en plasticpose – maks. 20 kuld/pose. Efter indsamling anbringes poserne på frost (-20 grader). Undersøgelser på KU har vist, at opbevaring ved

stuetemperatur medfører et betydeligt tab af følsomhed. Det er derfor meget vigtigt at lægge prøven på frost så hurtigt som muligt efter udtagelsen.

Baggrund

Traditionelt har undersøgelser for PRRS-virus været foretaget på blodprøver (serum) udtaget fra søer/grise mistænkt for infektion. Dette er, sammen med materiale fra døde eller svagfødte grise og næsesvabere fra sygdomsramte dyr, stadig de eneste tilladte prøvematerialer til afklaring af en klinisk mistanke, og disse undersøgelser skal foretages på Statens Serum Institut (SSI). I de senere år er danske dyrlæger begyndt at anvende andre prøvematerialer som spyt, enten fra en gruppe af grise (oral fluid – OF) eller fra kuld af grise inkl. soen inden fravæning (såkaldt "family oral fluid – FOF") [1-3], væske fra haler og testikler (såkaldt processing fluid – PF) [4-6], samt væske fra tunger fra døde grise (tongue tip fluid – TTF). Endvidere er der forsøgsvis anvendt luftprøver og yveraftørring som prøvemateriale.

Internationalt, specielt i USA, har der været gennemført en række forsøg med henblik på at undersøge, hvordan disse prøver mest hensigtsmæssigt udtages, opbevares og sendes til laboratoriet for at undgå, at virus nedbrydes under processen. Flere af de større danske dyrlægepraksis har efterhånden også en del erfaring med nogle af prøvematerialerne. Endelig har KU i samarbejde med SEGES Innovation udført en række undersøgelser med henblik på at vurdere, hvilken effekt forskellige procedurer, som f.eks. frysning og opbevaring ved stuetemperatur, har på følsomheden af testen for PRRS-virus.

Formål

På baggrund af viden beskrevet i den internationale litteratur og erfaringer fra danske dyrlægepraksis er der udarbejdet anbefalinger for, hvorledes de forskellige prøvematerialer udtages, håndteres, opbevares og transporteres til laboratoriet. Anbefalingerne er udarbejdet med henblik på at beskrive procedurer, der er lette at anvende i praksis. Procedurerne er beskrevet selvstændigt for hvert prøvemateriale og vil blive opdateret, såfremt der kommer nye resultater fra de undersøgelser, der udføres på KU.

Udstyr til spytprøver

Reb, plastikpose (f.eks. frysepose 4 liter) og plastikbeholder med skruelåg, der skal kunne lukkes forsvarligt, til opsamling af væske, f.eks. rør til næsesvabere uden væske i (eller f.eks. Varenr. 02-572-8001, Frisenette; Varenr. 62.547.004, Hounisen eller Varenr. 62.547.254, Hounisen). Køleskab/fryser til opbevaring. Anvend bomuldsreb (1,6 cm i diameter for slagtegrise og <0,8 cm for mindre grise). Brug ikke andre rebtyper end bomuld, da de kan indeholde stoffer, der hæmmer laboratorietesten. Hvis tykt reb anvendes til mindre grise, anbefales det at spalte rebet.

Procedure for indsamling af spytprøver

Hæng et reb per 30 grise/et kuld i en højde, så grisene kan nå det, uden rebet rører staldbunden (grisens skulderhøjde). Anvendes rebet i farestalden, så prøv at få soen til at bide i det, inden det hænges op, og hæng det så op, så både soen og pattegrisene kan nå det. Lad rebet hænge i 30-40 min. Fjern rebet og placer det i en ren plastikpose – vrid så meget væske ud af rebet som muligt, mens det er i posen, evt. ved at trække rebet i posen hen over sti-adskillelsen. Hæld væsken over i plastikbeholderen og skru låget forsvarligt på. Sørg for, at der minimum overhældes 2 ml væske til beholderen – gerne mere, men ikke helt op til kanten af røret.



Fotos: Reb hængt op i inventar ved smågrise; Rebet vrides for væske i en pose; Væsken hældes over i et rør med skruelåg, der lukkes godt

Mærk beholderen med dato, CHR-nummer samt evt. so-nummer. Kontaminering af væske med fæces kan let ske, men væsken kan stadig anvendes til test for PRRSV. Undgå sammenblanding af væske fra forskellige stier/enheder, der ønskes undersøgt, og skift udstyr, saks, handsker, mm. mellem stier.

Opbevaring og indsendelse af spytpøver (OF)

Enzymer i spytet kan nedbryde PRRSV, specielt ved stuetemperaturer. Undersøgelser på KU har vist, at opbevaring ved stuetemperatur medfører et signifikant tab af følsomhed. Derfor er det vigtigt at lægge prøven på køl så hurtigt som muligt efter udtagelsen.

Hvis prøven sendes til test på laboratoriet indenfor 5 dage, kan den opbevares på køl ved 4-8 grader. Ved længere opbevaringstid inden forsendelse (>5 dage) kan prøven fryses ved minimum -20 grader og gerne koldere. Ved frysning vil der være et tab i følsomhed, så det bør undgås, og det er specielt vigtigt at **undgå, at den samme prøve fryses og optøs flere gange**, da dette kan nedbryde virus yderligere.

Ved forsendelse skal prøverne tages direkte fra køl eller frost, lægges i en plasticpose, og over i en egnet vandtæt kasse sammen med 1-2 køleelementer. Det er afgørende **vigtigt at undgå opbevaring ved stuetemperatur under udtagelse, opbevaring og forsendelse**. Husk at medsende en udfyldt indsendelsesblanket med angivelse af, at materialet er oral fluid (OF)/spyt.

Udstyr til hale og testikel-væske (processing fluid, PF)

Plastikpose (stor frysepose eller lign.) og plastikbeholder med skruelåg til opsamling af væske. Beholderen skal kunne lukkes forsvarligt (f.eks. rør, der anvendes til næsesvabere). Køleskab/fryser til opbevaring.

Procedure for indsamling af PF-væske

Ved kastration og halekupering opsamles testikler og haler i en plastikpose, hvorpå der skrives dato, antal kuld og CHR-nummer – **maks. 20 kuld/pose** [5]. Efter indsamling anbringes poserne på frost (-20 grader). Undersøgelser på KU har vist, at opbevaring ved stuetemperatur medfører et betydeligt tab af følsomhed. Det er derfor meget vigtigt at lægge prøven på køl eller frost så hurtigt som muligt efter udtagelsen. Hvis indsamlingen foregår over længere tid eller afbrydes i længere tid (> 1 time), anbefales det at anbringe de indsamlede prøver på køl, indtil prøveindsamlingen genoptages.



Foto: Pose med testikler og haler fra maksimalt 20 kuld; Væsken hældes over i et rør med skruelåg, der lukkes godt

Optøning og opsamling af PF-væske

Forsøg på KU har vist, at PF-væske kan opbevares på frost i minimum 30 dage uden væsentligt tab af følsomhed. Pose med prøvemateriale optøs langsomt – helst i køleskab. Prøvevæsken fra det optøede væv opsamles i en beholder med skruelåg, eventuelt ved at anvende en engangssprøjte med kanyle, eller blot skære et lille hul i posen med en ren engangsskalpel. Sørg for, at vævsrester forinden presses op, så der kun står væske i spidsen af posen. Der skal minimum overføres 1,5-2 ml væske til beholderen, men gerne mere. Mærk beholderen tydeligt med dato og CHR, og anfør tydeligt på indsendelsessedlen, at det er processing fluid.

Opbevaring og indsendelse af PF-væske

Opbevar PF-prøven på køl ved 4-8 grader indtil forsendelse samme dag eller senest dagen efter.

Undgå at fryse den aftappede væske, da frys/tø kan forårsage nedbrydning af virus.

Ved forsendelse kommer PF-prøveret direkte fra køl i en plastikpose og en egnet vandtæt beholder sammen med 1-2 køleelementer. Det er **ekstremt vigtigt at undgå opbevaring ved stuetemperatur både under udtagelse, opbevaring og forsendelse**. Husk at medsende en udfyldt indsendelsesblanket, hvor prøvearten "processing fluid" fremgår tydeligt.

Veterinært laboratorium (L&F) kan modtage testikler og haler i frossen tilstand til aftapning af væske. Laboratoriet på SSI modtager ikke hele testikler og haler, men kun den aftappede væske.

Det er meget vigtigt at undgå opbevaring ved stuetemperatur under opbevaring og forsendelse. Skriv prøvemateriale "Processing Fluid" på indsendelsesblanketten.

Konklusion

Anbefalingerne beskriver, hvorledes spytpøver og hale og testikel-væske udtages, håndteres, opbevares og transporteres til de diagnostiske laboratorier til undersøgelse for PRRS-virus ved PCR-test. For spytpøver gælder det, at enzymer i spytet kan nedbryde PRRS-virus specielt ved stuetemperatur. Opbevaring ved stuetemperatur medfører et signifikant tab af følsomhed i PCR-testen. Derfor er det vigtigt at lægge spytpøven på køl så hurtigt som muligt efter udtagelsen.

Ved kastration og halekupering opsamles testikler og haler i en plasticpose – maks. 20 kuld/pose. Efter indsamling anbringes poserne på frost (-20 grader). Opbevaring ved stuetemperatur medfører en betydeligt tab af følsomhed. Det er derfor meget vigtigt at lægge prøven på frost så hurtigt som muligt efter udtagelsen.

Referencer

- [1] Olsen, C. et al. Probability of detecting porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection using pen-based swine oral fluid specimens as a function of within-pen prevalence. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 328–335 (2013).
- [2] Ramirez, A. et al. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev. Vet. Med.* 104, 292–300 (2012).
- [3] Prickett, J. R. & Zimmerman, J. J. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res. Rev.* 11, 207–216 (2010).
- [4] López, W. A. et al. Practical aspects of PRRSV RNA detection in processing fluids collected in commercial swine farms. *Prev. Vet. Med.* 180, 105021 (2020).
- [5] López, W. A. et al. Probability of PRRS virus detection in pooled processing fluid samples. *Vet.Mic.* 261 (2021) 109190
- [6] López, W. et al. Considerations in the use of processing fluids for the detection of PRRSV RNA and antibody. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 34, 859–863 (2022).

Afprøvning nr. 1825

NAV nr.: 1452

//KARL//

Dyregruppe: grise

Fagområde: virussygdomme, PRRS virus

Nøgleord: PRRS, virus