

Anbefalinger for håndtering af prøvematerialer til undersøgelse for PRRS-virus ved PCR

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

a SEGES Innovation P/S, Husdyr

b Københavns Universitet, Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab

c Veterinært Laboratorium Kjellerup, Landbrug & Fødevarer

d Statens Serum Institut

STØTTET AF

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

I de senere år er danske dyrlæger begyndt at anvende prøvematerialer som spyt (OF/oral fluid), væske fra afklippede haler og testikler (PF/processing fluid) og senest tungespidses fra døde grise (TTF/tongue tip fluid) til undersøgelse for PRRS-virus (PRRSV) ved PCR-test. SEGES Innovation, Københavns Universitet (KU), Veterinært Laboratorium Kjellerup og Statens Serum Institut (SSI) har udarbejdet disse anbefalinger for, hvorledes denne type prøvematerialer bør udtages, håndteres, opbevares og transporteres til laboratorierne. Anbefalingerne er i dette notat opdateret med TTF prøver. Notatet afløser Notat nr. 2217.

Sammendrag

Anbefalingerne beskriver, hvorledes spytp prøver, haler/testikelvæske, og tungespidses udtages, håndteres, opbevares og transporteres til de diagnostiske laboratorier til undersøgelse for PRRS-virus ved PCR-test.

For spytp prøver 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 i PCR-testen. Derfor er det vigtigt at lægge prøven på køl så hurtigt som muligt efter udtagningen.

Ved kastration opsamles testikler og haler i en plastikpose – maks. 20 kuld/pose. Tungespidses kan indsamles fra døde grise – mindst 20 stk. i en prøve. Efter indsamling, anbringes poserne på frost (- 20 °C). Undersøgelser på KU har vist, at opbevaring ved stuetemperatur medfører et betydeligt tab af følsomhed i PCR-testen. Det er derfor meget vigtigt at lægge prøven på frost så hurtigt som muligt

efter udtagningen. Alle prøver skal være på køl ved forsendelse til laboratoriet. Korte vejledninger ligger i Appendiks.

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 fravænning (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) [7]. Desuden 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 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.

Spytprøver (oral fluid, OF)

Udstyr til opsamling af OF-væske

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 (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 opsamling af OF-væske

Hæng ét reb per 30 grise/et kuld i en højde, så grisene kan nå det, uden at 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 minutter. 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 stadsdskillelsen. Hæld væsken over i plastikbeholderen og skru låget forsvarligt på (Figur 1). Sørg for, at der minimum overhældes 2 ml væske til beholderen – gerne mere, men ikke helt op til kanten af røret.



Figur 1: Rebet hænges op i inventar ved smågrise eller i farestalden; Rebet vrides for væske i en pose; væsken hældes over i et rør med skruelåg, der lukkes godt.

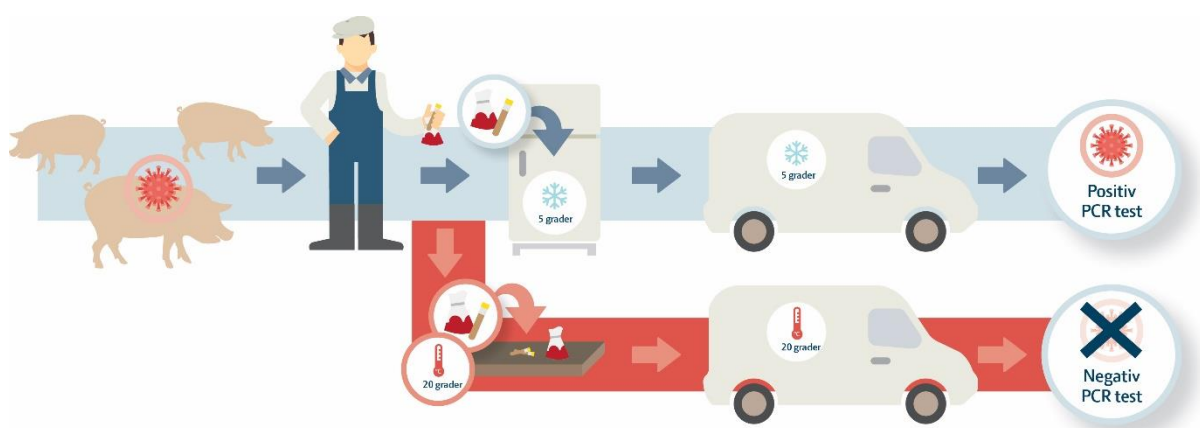
Mærk beholderen med dato, CHR-nummer samt evt. so-nummer. Kontaminering af væske med fæces kan let ske, men væsken kan stadig anvendes til test for PRRSV. Undgå sammenblanding af væske fra forskellige stier/enheder, der ønskes undersøgt, og skift udstyr, saks, handsker mm. mellem stier.

Opbevaring og indsendelse af OF-væske

Enzymer i spyttet 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 udtagningen.

Hvis prøven sendes til test på laboratoriet indenfor 5 dage, kan den opbevares på køl ved 4-8 °C. Ved længere opbevaringstid inden forsendelse (>5 dage), kan prøven fryses ved minimum -20 °C 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 plastikpose, og over i en egnet vandtæt kasse sammen med 1-2 køleelementer. Det er afgørende **vigtigt at undgå opbevaring ved stuetemperatur under udtagning, opbevaring og forsendelse** (Figur 2). Husk at medsende en udfyldt indsendelsesblanket med angivelse af, at materialet er spyt/oral fluid (OF), dato for indsamling og udtagelsesdato. Se kort vejledning i Appendiks.



Figur 2: Det er meget vigtigt, at prøver til PCR-test for PRRS-virus opbevares ved på køl efter udtagning, ved opbevaring og under forsendelse til laboratoriet. PRRS-virus nedbrydes ved stuetemperatur.

Haler og testikelvæske (processing fluid, PF)

Udstyr til opsamling af PF-væske

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 opsamling af PF-væske

Ved kastration og halekupering opsamles testikler og haler i en plastikpose (Figur 3), hvorpå der skrives dato, antal kuld og CHR-nummer – **maks. 20 kuld/pose** [5]. Efter indsamling anbringes poserne på frost (-20 °C). 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 udtagningen. 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.



Figur 3: 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 ved 4-8 °C (f.eks. i køleskab). Prøvevæsken fra det optøede væv opsamles i en beholder med skruelåg, eventuelt ved at anvende en engangssprøjte med kanyler, 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 2 ml væske til beholderen, men gerne mere. Mærk beholderen tydeligt med PF, udtagelsesdato og CHR, og anfør tydeligt på indsendelsessedlen, at det er processing fluid.

Opbevaring og indsendelse af PF-væske

Opbevar den tappede PF-prøve på køl ved 4-8 °C indtil forsendelse samme dag eller senest dagen efter. **Undgå at fryse den aftappede væske**, da frys/tø kan forårsage nedbrydning af virus.

Ved forsendelse kommes PF-prøverøret 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 udtagning, opbevaring og forsendelse**. Husk at medsende en udfyldt indsendelsesblanket, hvor prøvearten "processing fluid" fremgår tydeligt.

Veterinært laboratorium Kjellerup (L&F) kan modtage testikler og haler i frossen tilstand til aftapning af væske. Veterinært Laboratorium Kjellerup tager et gebyr for aftapning på laboratoriet. Laboratoriet på SSI modtager ikke hele testikler og haler, men kun den aftappede væske. Indsendes PF som væv, skal posen med testikler og haler dobbelt-emballeres. Se kort vejledning i Appendiks.

Tungespidsvæske (tongue tip fluid, TTF)

Udstyr til opsamling af TTF-væske

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). Fryser og køleskab til opbevaring.

Procedure for opsamling af TTF-væske

Tungespidser udtages fra døde grise, det kan være hensigtsmæssigt kun at samle tungestykker fra dødfødte grise eller døde pattegrise. Hold fast i tungen med en tang eller en pincet med modhager (Figur 4). Skær eller klip et stykke på 2 cm. Der skal samles mindst 20 tungestykker i en plastikpose, hvorpå der skrives dato, dødfødte/døde grise og CHR-nummer – **mindst 20 stk./pose**. Efter indsamling anbringes poserne på frost (-20 °C). 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 udtagningen. Hvis indsamlingen foregår over længere tid, anbefales det at anbringe de indsamlede prøver på køl eller frost, indtil prøveindsamlingen genoptages.



Figur 4: Tungestykke fra død pattegris; pose med tungestykker fra mindst 20 grise til TTF-væske.

Optøning og opsamling af TTF-væske

Pose med prøvemateriale optøs langsomt ved 4-8 °C. Prøvevæsken fra det optøede væv opsamles i en beholder med skruelåg, eventuelt ved at anvende en engangssprøjte med kanyler, 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 ml væske** til beholderen, men gerne mere. Mærk beholderen tydeligt med dato og CHR, og anfør tydeligt på indsendelsessedlen, at det er TTF-væske. Kan der ikke tappes 1 ml TTF-væske, kan fortynding foretages på laboratoriet.

Opbevaring og indsendelse af TTF-væske

Opbevar den tappede TTF-prøve på køl ved 4-8 °C indtil forsendelse samme dag eller senest dagen efter. **Undgå at fryse den aftappede væske**, da frys/tø kan forårsage nedbrydning af virus.

Ved forsendelse kommes TTF-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 udtagning, opbevaring og forsendelse**. Husk at medsende en udfyldt indsendelsesblanket, hvor prøvearten "TTF-væske" fremgår tydeligt.

Veterinært Laboratorium Kjellerup (L&F) kan modtage tungestykker i frossen tilstand til aftapning af væske. Veterinært Laboratorium Kjellerup tager et gebyr for aftapning på laboratoriet. Laboratoriet på SSI modtager ikke tungestykker, men kun den aftappede TTF-væske. Indsendes TTF som væv skal posen med tunger dobbelt-emballeres. Se kort vejledning i Appendiks.

PF, OF og TTF prøver til PCR analyse for PRRS-virus skal alle holdes på køl – både i besætningen og under forsendelsen til laboratoriet.

Konklusion

Anbefalingerne beskriver, hvorledes spytp prøver, hale, testikelvæske og tungespidser udtages, håndteres, opbevares og transporteres til de diagnostiske laboratorier til undersøgelse for PRRS-virus ved PCR-test. For spytp prøver 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 spytp prøven på køl så hurtigt som muligt efter udtagelsen.

Der skal være mindst 20 tungestykker i en pose til TTF. Testikler samt haler samles i en plastikpose – maks. 20 kuld/pose. Efter indsamling anbringes poserne på frost (-20 °C). Opbevaring ved stuetemperatur medfører et betydeligt tab af følsomhed. Det er derfor meget vigtigt at lægge prøven på frost så hurtigt som muligt efter udtagningen.

Fælles for disse prøvematerialer er, at de også ved forsendelsen til laboratoriet skal holdes kolde for at hindre tab i PCR-testens følsomhed.

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).
- [7] Machado et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA detection in tongue tips from dead animals Front. Vet. Sci., Sec. Veterinary Infectious Diseases <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.993442> (2022).

Afprøvning nr. 1825

Projekt nr.: 101452

// JAHP//

Dyregruppe: grise

Fagområde: virussygdomme, PRRS-virus

Nøgleord: PRRS, PRRS-virus

Processing Fluid (PF) fra testikler og haler

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

Version 1.0 – 2023

PRRS
TAG HANDLING



Ved kastration og halekupering opsamles testikler og haler i en plasticpose

Maksimalt testikler og haler fra 20 kuld i en pose



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

* Pose med testikler og haler kan sendes frosne til L&F Veterinært laboratorium

Husk at posen skal tømme op i køleskab
Klip et lille hul i posen
PF-prøven opsamles i en beholder med skruelåg

Sørg for, at der minimum er 2 ml PF-prøve i røret
PF-prøven skal på køl (4-8 grader)



PF-prøven tages direkte fra køleskab

Emballeres godt sammen med køleelementer

Husk at skrive PF-prøve på indsendelsesblanketten

*L&F Veterinært laboratorium, Kjellerup kan modtage frosne testikler/haler til aftapning af væske.
SSI modtager ikke hele testikler/haler, men kun den aftappede væske (processing fluid).

STØTTET AF
Svineafgiftsfonden

KØBENHAVNS
UNIVERSITET

STATENS
SERUM
INSTITUT



SEGES
INNOVATION

Spytprøver (OF oral fluid)

Vejledning til udtagning, opbevaring og forsendelse af spytp prøver til PCR for PRRS

Version 1.0 – 2023

PRRS
TAG HANDLING



Udtagning af spytp prøve med bomuldsreb

Farestald: Prøv at få soen til at bide i rebet, inden det hænges op. Hænges, så både soen og pattegrisene kan nå det. Rebet må ikke røre stibunden
Lad rebet hænge i 30-40 min

Min
30
min



Min
30
min

Udtagning af spytp prøve med bomuldsreb

Smågrise/slagtesvin: Hæng et reb per 30 grise, rebet må ikke røre staldbunden
Lad rebet hænge i 30-40 min

Placer rebet i en ren plasticpose og vrid så meget væske ud af rebet som muligt. Klip et lille hul i posen.
Spytp prøve opsamles i en beholder med skruelåg
Sørg for, at der minimum er 2 ml spytp prøve i røret

Min
2
ml



Grader
4-8

Grader
-20

Spytp prøven skal på køl (4-8 grader)
så hurtigt som muligt efter udtagelsen

Hvis spytp prøven skal opbevares længere end 5 dage
inden forsendelse skal prøven fryses ved -20 grader

Prøven tages direkte fra køleskab eller fryser
Emballeres godt sammen med køleelementer

Husk at skrive spytp prøve (OF oral fluid) på
indsendelsesblanketten

Grader
4-8



STØTET AF
Svineafgiftsfonden

KØBENHAVNS
UNIVERSITET

STATENS
SERUM
INSTITUT



SEGES
INNOVATION

Tungeprøver (TTF tunge fluid)

Vejledning til udtagning, opbevaring og forsendelse af tungeprøver/TTF til PCR for PRRS

Version 1.0 – 2024

PRRS
TAG HANDLING



Tungevæv udtages fra døde grise

- Dødfødte grise
- Døde pattegrise
- Døde smågrise



Hold fast i tungen med en tang eller en pincet med modhager

Skær eller klip, så du får et stykke på ca 2 cm

Saml mindst 20 tungestykker til en analyse

Tørre tunger kan ikke undersøges



Læg tungestykkerne i en frysepose, luk posen med en stram knude og læg den på frost

Hvis prøven skal analyseres på SSI skal posen med tungestykker tøs op i køleskab.

Mindst 1 ml TTF-væske opsamles i en beholder med skruelåg og sendes til analyse vedlagt køleelement



De frosne tungestykker lægges i en ekstra pose, der lukkes med en stram knude.

Husk at skrive TTF-prøve på indsendelsesblanketten, og skriv hvilken gruppe grise, der er prøver af

STØTTET AF
Svineafgiftsfonden

KØBENHAVNS
UNIVERSITET



STATENS
SERUM
INSTITUT



SEGES
INNOVATION