

ELISA-påvisning af antistoffer mod PRRSV i spyt kan blive et alternativ til blodprøver

Björg Skovmand Helstad^a, Nicole Bakkegård Goecke^a, Elisabeth Okholm Nielsen^b og Lars Erik Larsen^a

^aKøbenhavns Universitet, Institut for Veterinær og Dyrevidenskab, Frederiksberg, Danmark

^bSEGES Innovation P/S, Danmark

STØTTET AF

Svineafgiftsfonden

Hovedkonklusion

Resultaterne tyder på, at anvendelse af spytprøver til påvisning af antistoffer mod PRRS-virus i ELISA-test er lige så sensitiv og specifik som blodprøver, men anvendelse af spyt er en mindre invasiv, tids- og ressourcekrævende måde at overvåge for PRRSV-antistoffer. Overvågning af antistoffer mod PRRSV til bestemmelse af PRRS-status i danske besætninger er en essentiel del af strategien for at reducere forekomsten af sygdommen. Derfor er det interessant fortsat at udvikle nye og lettere måder at indsamle prøvemateriale til antistoftests. Anvendelse af spytprøver til analyse i ELISA for antistoffer mod PRRSV i grisebesætninger som alternativ til blodprøver vil kræve yderligere undersøgelser og implementering af testen på det veterinære laboratorium i Kjellerup.

Sammendrag

Resultaterne fra dette projekt indikerer, at antistofmåling i spytprøver på stiniveau kan være et godt værktøj til overvågning af Porcin Reproduktions- og Respirationssyndrom Virus (PRRSV) i grisebesætninger. Metoden er mindre tids- og ressourcekrævende end udtagelse af blodprøver og er samtidig mindre invasiv for dyrene.

Det kommercielt tilgængelige Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-kit (IDEXX PRRS Oral Fluids Ab Test, IDEXX Laboratories, USA, Westbrook, Maine) blev testet til dette projekt. ELISA-kittet blev testet på spytprøver fra søer, slagtegrise og smågrise fra henholdsvis én PRRSV1-positiv, én PRRSV2-positiv og én PRRSV-negativ besætning. Resultaterne viser, at kittet har semikvantitative egenskaber og kan detektere antistoffer mod både PRRSV1 og PRRSV2.

Opbevaring af prøvematerialet på frost eller køl kort tid efter udtagning er vigtigt for prøveresultatet, da antistofniveauet falder over tid ved opbevaring ved stuetemperatur.

Detektion af PRRSV-antistofpositive grise på stiniveau ved brug af spytpøver, testet med PRRS OF ELISA-kittet (IDEXX), er sammenlignelig med resultatet ved brug af serumprøver, testet med det tilsvarende ELISA-kit (IDEXX PRRS X3 Ab Test, IDEXX Laboratories, USA, Westbrook, Maine) til detektion af antistoffer mod PRRSV i serum og plasma.

Hæver man grænsen, *cut off*, for, hvornår en prøve fortolkes som positiv, stiger specificiteten yderligere uden fald i sensitiviteten. Specificiteten og sensitiviteten af IDEXX PRRS OF kittet til spytpøver blev udregnet med resultaterne fra IDEXX PRRS X3 kittet til serumprøver som Golden Standard. Med et *cut off* på $S/P > 0,4$, blev sensitiviteten for alle aldersgrupper over 90 %. Hvis *cut off* blev hævet til $S/P > 1,0$, steg specificiteten særligt for grise over 30 kg, hvor sensitivitet og specificitet nåede op på 100 %.

Formålet med dette projekt var at lave en præliminær vurdering af potentialet for brugen af spyt og det kommercielt tilgængelige PRRS OF ELISA (IDEXX) kit til måling og overvågning af antistoffer mod PRRSV i danske grise.

Anvendelse af spytpøver til analyse i ELISA for antistoffer mod PRRSV i grisebesætninger som alternativ til blodprøver vil kræve yderligere undersøgelser og implementering af testen på det veterinære laboratorium i Kjellerup.

Baggrund

I 2024 har cirka 26 % af danske grisebesætninger en deklareret positiv PRRS-sundhedsstatus [1]. I 2022 blev "Strategi til reduktion af PRRS hos grise i Danmark" sat i gang [2], hvor målet var at øge andelen af deklarerede PRRSV-antistofnegative besætninger. Tidligere var deklaration for PRRSV frivillig, men med en ny bekendtgørelse blev deklaration af PRRS-status lovpligtig. Dog er det stadig frivilligt, hvorvidt producenter ønsker at sanere for at ændre besætningens PRRS-status.

For at opnå og bibeholde negativ PRRS-sundhedsstatus kræves det bl.a., at der mindst en gang årligt udtages 20 blodprøver pr. CHR-nummer, som er negative for antistoffer mod PRRSV. I bekendtgørelsen (BEK nr. 997 af 29/06/2023) er det beskrevet, hvor mange og fra hvilke dyr, der skal udtages prøver, for de forskellige slags besætninger [3]. Ifølge bekendtgørelsen skal blodprøver undersøges for forekomst af PRRSV-antistoffer. Det er dog både tids- og ressourcekrævende at udtage blodprøver fra dyrene. En lettere og mindre invasiv metode til overvågning af PRRSV-antistoffer kunne være at tage spytpøver på stiniveau. Dette kan gøres ved at lade et reb hænge i stien og efter 20-40 minutter, når grisene har tygget i rebet, vride væsken ud af det. Påvisning af antistoffer mod PRRSV i spyt har i tidligere undersøgelser vist at have en sammenlignelig specificitet og sensitivitet som antistofpåvisning i serum [4–9]. I nogle af forsøgene havde spytpøverne en lavere specificitet end serumprøverne, men generelt viste forsøgene, at spytpøver har potentiale til at anvendelse i overvågningssammenhænge [10, 11]. I en undersøgelse af forskellige Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits til spytpøver præsterede IDEXX PRRS OF Ab Test (IDEXX Laboratories, USA, Westbrook, Maine) bedst med højst sensitivitet og specificitet ved flest forskellige *cut off* værdier [5].

Formålet med dette projekt var at lave en præliminær vurdering af potentialet for brugen af spyt og et kommercielt tilgængeligt ELISA-kit (IDEXX PRRS OF) til måling og overvågning af antistoffer mod PRRSV i danske grise. Dette blev vurderet ved at teste kittets semikvantitative egenskaber, robustheden af spyt som prøvemateriale og ved at sammenligne resultatet af parrede spyt- og

serumprøver testet hhv. med IDEXX PRRS OF og det tilsvarende kit til påvisning af antistoffer i serum, IDEXX PRRSV X3 Ab Test (IDEXX Laboratories, USA, Westbrook, Maine).

Materialer og metoder

Prøvemateriale til undersøgelsen

Der er undersøgt prøvemateriale fra tre forskellige prøveindsamlinger:

- Spytprøver indsamlet i 2024 fra tre grisebesætninger
- Spytt- og blodprøver indsamlet i 2024 i en grisebesætning
- Spytt- og blodprøver indsamlet i 2019 fra 18 grisebesætninger

Spytprøver indsamlet i 2024 fra tre grisebesætninger

Spytprøver blev indsamlet fra tre forskellige sobesætninger: én med positiv PRRS1-status, én med positiv PRRS2-status og én besætning med negativ PRRS-status. Prøverne blev indsamlet fra stier med drægtige søer, stier med polte i en alder tilsvarende slagtegrise samt stier med smågrise otte til ti uger efter fravænning. Der blev indsamlet prøver fra fire stier fra hver aldersgruppe (se tabel 1). Til projektet med parrede spytt- og serumprøver blev der indsamlet spytprøver fra to stier i besætning med positiv PRRS2-status og der blev udtaget serumprøver fra fire grise, som blev observeret tygge i rebet.

Spytprøverne blev indsamlet med reb, som blev hængt op i hver sti 30-50 cm over stibunden, i 30-40 minutter. Der var ikke opsyn med præcis, hvor mange grise, der bed i rebene, men det blev noteret, at der var stor interesse i grupperne med polte og smågrise og mindre interesse hos søerne. Spyttet blev vredet ud af rebene og hældt over i 50 ml rør. Blodprøver blev indsamlet via vena jugularis i 10 ml serumrør fra de grise i stien, der tyggede i rebet.

Alle prøver blev opbevaret på køl indtil de blev transporteret med køleelementer til laboratoriet på Københavns Universitet, Frederiksberg. Hver spytprøve blev fordelt til 2 ml rør og opbevaret ved -80°C. Inden ELISA-test, blev prøvematerialet optøet, rystet ca. 10 sekunder og centrifugeret ved 5500 g i 3 minutter. Blodprøver blev centrifugeret ved 1200 RPM i 3 minutter og supernatanten blev overført til 2 ml prøverør som blev opbevaret ved -80°C.

Laboratorietest

IDEXX PRRS OF ELISA-kit (IDEXX) blev anvendt til test af spytprøverne, mens IDEXX PRRS 3X-kittet (IDEXX) blev anvendt til serumprøverne. ELISA-test for hhv. spytt- og serumprøver blev udført som beskrevet i producentmanualen: Spytprøverne blev fortyndet 1:2 med sample diluent og derefter overført til ELISA-brøndene. Først blev pladen inkuberet i to timer ved stuetemperatur, derefter vasket med vaskebuffer fire gange, tilført 100 µL konjugat og inkuberet igen i 30 minutter. Herefter blev brøndene vasket igen fire gange og tilført 100 µL TMB-substrat. Efter 15 minutters inkubation blev der tilsat 100 µL stop solution og pladen blev aflæst ved 450 nm og 650 nm.

Serumprøverne blev fortyndet 1:40 med sample diluent og derefter overført til ELISA-brøndene. Pladen blev inkuberet i 30 minutter, derefter vasket med vaskebuffer fire gange, tilført 100 µL konjugat og inkuberet igen i 30 minutter. Herefter blev brøndene vasket igen fire gange og tilført 100 µL TMB-substrat. Efter 15 minutters inkubation blev der tilsat 100 µL stop solution og pladen blev aflæst ved 450 nm.

Resultatet for ELISA-testen blev angivet i S/P værdi, som er et udtryk for den udregnede sample-to-positive-ratio.

S/P værdien udregnes ved:

$$\frac{S}{P} = \frac{\text{Sample} - \text{gns af negative kontrolprøver}}{\text{gns af positive kontroller} - \text{gns af negative kontrol}}$$

Prøver med en S/P-værdi lig med eller højere end 0,4 blev fortolket som positive [12, 13].

Laboratoriemæssig performance

Spyt fra den negative besætning blev samlet til pools for hver aldersgruppe. Til performancetesten blev den mest positive prøve fra hver aldersgruppe udvalgt og fortyndet med spyt fra den alderssvarende pool af negativt spyt fra den negative besætning. Prøverne blev fortyndet fem gange i forholdet 1:5 og testet i dobbeltbestemmelse og derudover blev den negative pool også testet. Fortyndingsrækken blev blandet først i 1,5 ml rør og mellem hver fortynding blev prøverøret rystet i ca. 10 sekunder og centrifugeret kort. Herefter blev de fortyndede prøver overført til en prøveplade og fortyndet 1:2 med sample diluent før overførsel til ELISA-pladen.

Betydning af opbevaringstemperatur og -tid

Den mest positive prøve fra hver aldersgruppe blev udvalgt og udportioneret til fire forskellige rør. Fra den negative besætning blev prøven med den laveste S/P-værdi fra hver aldersgruppe valgt. Rørene blev opbevaret ved henholdsvis 37°C, stuetemperatur (ca. 20-22°C), 4°C og -20°C. Alle prøverne blev testet lige efter udportionering, efter 24, 48 og 96 timer i dobbeltbestemmelse for de positive besætninger og enkeltbestemmelse for den negative besætning.

Spyt og blodprøver indsamlet i 2024 i en grisebesætning

Prøver fra to stier i en PRRSV2-positiv besætning blev anvendt i et pilotprojekt, hvor ELISA-resultater fra spyt- og serumprøver blev sammenlignet. Der blev udtaget én spytprøve fra hver sti og fra hver sti blev der også udtaget serumprøver fra fire af grisene, som blev observeret tygge i rebet. Spytpøverne blev testet samtidig med spytpøverne fra test af robusthed. Testen af serumprøverne blev udført med IDEXX PRRS X3 kittet til antistofdetektion i serum og plasma.

Spyt og blodprøver indsamlet i 2019 fra 18 grisebesætninger

I et tidligere forskningsprojekt i 2019 blev der indsamlet ti serumprøver fra hver besætning (to-tre fra hver sti) og en spytprøve fra hver sti. Serumprøverne blev i 2019 testet med PRRS X3 ELISA-kittet (IDEXX) og spytpøverne med PRRS OF ELISA-kittet (IDEXX) på det daværende DTU Veterinærinstitut. For begge kits blev en S/P-værdi på 0,4 brugt som *cut off*.

Til dette sammenligningsprojekt blev prøveresultater fra smågrise, slagtegrise og to poltehold medtaget, svarende til i alt 186 stier fra 18 besætninger. Der er kun medtaget data, hvor det var muligt at sikre, at serum- og spytpøverne kom fra de samme stier og prøverne var udtaget samme dag. Da prøveresultaterne stammer fra et ældre projekt, kan vi ikke vide, om der er taget højde for, om grisene, der er udtaget serum fra, er de samme som dem, der har tygget i rebet. Det er ej heller beskrevet, hvor mange grise, der reelt har tygget i rebet for hver sti.

Formålet med sammenligningsprojektet var at vurdere, om PRRS OF ELISA-kittet (IDEXX) kan bruges til at detektere stier med positive grise med sammenlignelig specificitet og sensitivitet som PRRS X3 ELISA-serumkittet (IDEXX). Derfor blev stier med bare én serum positiv gris talt som positive – også selvom den gennemsnitlige S/P-værdi i serumprøverne for den sti var under 0,4.

Specificiteten og sensitiviteten af PRRS OF ELISA-kittet (IDEXX) blev beregnet ud fra en antagelse om, at PRRS X3 ELISA (IDEXX) resultatet er sandt. Specificitet og sensitivitet blev også beregnet for testen, hvis *cut off* ændres til 1,0. Overensstemmelsen af resultaterne fra de to tests blev undersøgt ved beregning og fortolkning af Cohens Kappa koefficient [14].

Resultater og diskussion

Alle spytp prøver blev testet med PRRS OF ELISA-kittet (IDEXX) ved modtagelse og den mest positive prøve fra hver aldersgruppe blev udvalgt. Alle prøver fra besætningerne med positiv PRRS-status var positive med S/P værdier langt over kittets *cut off* på 0,4. Alle prøverne fra besætningen med negativ PRRS-status var negative (Appendiks A, Tabel A1).

Laboratoriemæssig performance

De PRRSV1-positive prøver kunne fortyndes 1:125 før resultater kom under *cut off* for søerne og smågrisene og 1:625 for slagtegrisene (Tabel 1). Ved den første fortynding af spyt fra slagtegrise, var der ikke sket nogen reduktion i S/P-værdien (Tabel 1).

Tabel 1. PRRSV1 1:5 fortyndingsrække. Hver kolonne viser resultater for hver fortynding. Prøverne er testet i dobbeltbestemmelse. Positive prøver med S/P>0,4 er markeret med fed tekst. Kolonnen yderst til højre er kontrol af den negative spyt-pool. UF = ufortyndet.

Aldersgruppe/virus/ID	UF	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	Neg spyt
PRRSV1 So KU-2024-105-2	7,15	3,49	0,98	0,30	0,15	0,14	0,18
	7,19	3,45	0,88	0,29	0,19	0,19	0,22
PRRSV1 Slagtegrise KU-2024-105-6	7,04	7,20	2,71	0,64	0,15	0,07	0,05
	7,53	7,20	2,71	0,65	0,17	0,06	0,05
PRRSV1 Smågrise KU-2024-105-12	7,23	3,99	1,12	0,34	0,16	0,16	0,18
	7,28	4,02	1,16	0,32	0,19	0,20	0,16

Reduktionen i S/P-værdien for de PRRSV2-positive små- og slagtegrise var også væsentligt lavere end for søerne mellem første og anden fortynding og kunne fortyndes 1:625, før de kom under *cut off*, mens prøver fra søerne kun kunne fortyndes 1:125 før de blev negative (Tabel 2).

Tabel 2. PRRSV2 1:5 fortyndingsrække. Hver kolonne viser resultater for hver fortynding. Prøverne er testet i dobbeltbestemmelse. Positive prøver med S/P>0,4 er markeret med fed tekst. Kolonnen yderst til højre er kontrol af den negative spyt-pool. UF = ufortyndet.

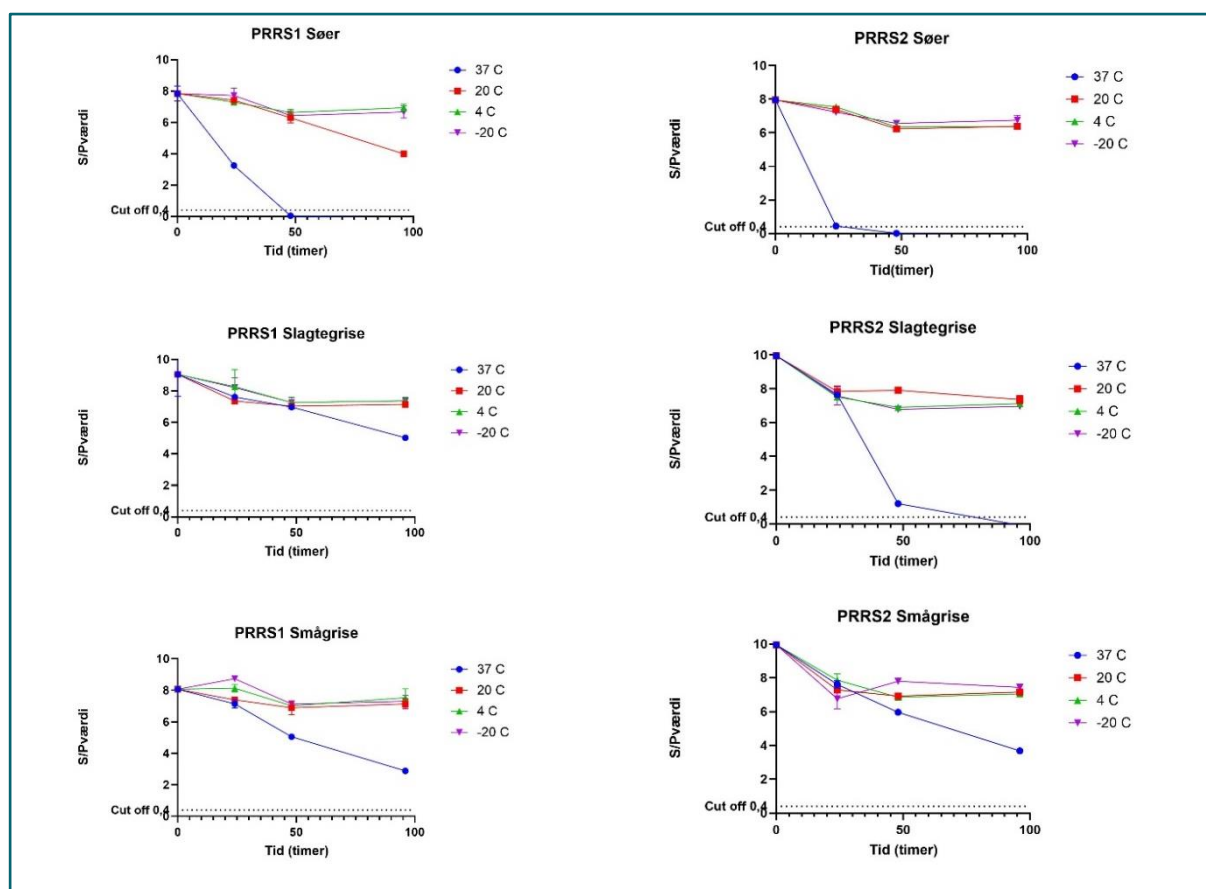
Aldersgruppe/virus/ID	UF	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	Neg spyt
PRRSV2 So KU-2024-98-3	8,19	2,88	0,58	0,21	0,19	0,14	0,16
	8,45	3,38	0,71	0,22	0,16	0,15	0,14
PRRSV2 Slagtegrise KU-2024-98-7	8,63	5,97	1,68	0,42	0,12	0,08	0,06
	9,89	6,09	1,79	0,42	0,15	0,09	0,08
PRRSV2 Smågrise KU-2024-98-9	8,75	5,97	1,69	0,57	0,66	0,25	0,22
	8,72	5,63	1,84	0,55	0,35	0,30	0,19

Resultater fra performancetesten og fortyndingsrækken viste, at det var muligt at fortynde en meget positiv prøve nok til, at den kom under *cut off*, hvilket viser, at kittet er semikvantitativt.

Betydning af opbevaringstemperatur og -tid

Generelt faldt S/P-værdien for alle prøver efter opbevaring i 24 timer og faldt yderligere efter 48 timer. Efterfølgende opbevaring på køl (5-7°C) og frys (-20°C) i 96 timer medførte ikke et fald. Prøver opbevaret ved stuetemperatur havde generelt en stabil S/P-ratio ved 48 og 96 timer for begge positive besætninger med undtagelse af de PRRSV1-positive søer, hvor der var et fald. S/P-værdien for alle prøver opbevaret ved 37°C faldt markant mellem hvert testtidspunkt og prøverne fra de positive søer kom under *cut off* allerede efter 24 timer for de PRRSV2-positive og efter 48 timer for de PRRSV1-positive grise (Figur 1). Alle negative prøver forblev negative, men faldt yderligere i S/P-værdi i løbet af forsøget (data ikke vist).

I robusthedsforsøget forblev S/P-værdierne fra prøverne opbevaret ved køle- og frysetemperaturer stabile i op til 96 timer. Dog var der et fald ved alle prøverne fra udportionering frem til testen ved 48 timer, som kan skyldes optøningen af prøverne fra den oprindelige opbevaring på -80°C.

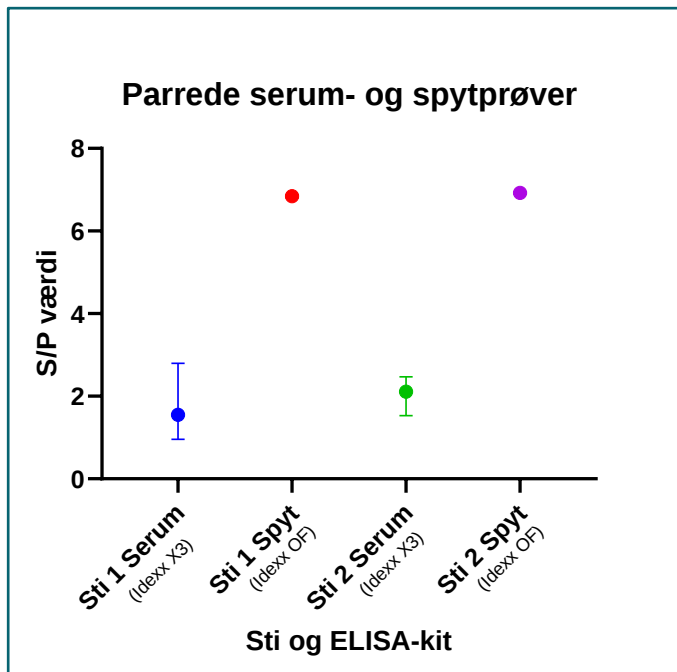


Figur 1: Udvikling af S/P-værdi ved forskellige opbevaringstemperaturer (37°C, 20°C, 4°C, -20°C) over tid for PRRSV-1 og PRRSV-2 positive grise i tre aldersgrupper (søer, slagtegrise, smågrise). De forskellige farver repræsenterer temperaturen, hvorved prøven var opbevaret. ELISA-kittets *cut off* er markeret ved 0,4 på y-aksen. Der er testet én prøve pr. aldersgruppe og opbevaringstemperatur.

S/P-værdierne for spytp prøver taget fra søer faldt hurtigst og mest markant, hvilket kan tyde på, at spyt hos voksne grise indeholder flere enzymer eller lignende, der kan nedbryde antistofferne. Fablet et al., 2017 undersøgte også både søer og slagtegrise, og de fandt, at specificiteten af deres spyttest blev lavere for søerne end ved slagtegrisene, hvilket de blandt andet tilskriver kompositionen og antistofniveauet i spyt hos voksne grise [7]. Resultaterne fra vores projekt bekræfter, at det er vigtigt for prøveresultatet, at prøver opbevares på køl eller frost kort tid efter udtagning. Det ville være interessant at udføre yderligere tests på prøvemateriale efter opbevaring ved længere tid end kun 96 timer samt på mindre positivt prøvemateriale.

Test af spyt og blodprøver indsamlet i 2024 i en grisebesætning

Begge stier var positive for PRRSV i begge ELISA-tests (spyt og serum). I begge stier var S/P-værdien væsentligt højere ved brug af PRRS OF ELISA-kittet (IDEXX) for spytprøver end ved brug af PRRS 3X ELISA-kittet (IDEXX) til serum (Figur 2).



Figur 2: Sammenligning af S/P-værdier for spyt- og serum prøver taget fra to stier og analyseret med IDEXX PRRS X3 kit og IDEXX PRRS OF kit. Hver prik repræsenterer S/P-værdien fra hver sti i hhv. serum- og spytprøve testet i de to ELISA-kits.

I pilotforsøget sås fuld overensstemmelse mellem de to ELISA-tests i forhold til, om stien var positiv for antistoffer eller ej. S/P-værdien var dog væsentligt højere i spytprøverne end i serumprøverne, hvilket også var tilfældet i de parrede prøver fra 2019. Det kunne tyde på, at værdierne generelt ligger højere i spytkittet end serumkittet. Muligvis hænger det sammen med, at den første inkubationsperiode i testprotokollen for spytkittet er to timer, mens det for serumkittet kun er en halv time. Derudover fortyndes prøverne kun 1:2 i spytkittet, mens de fortyndes 1:40 i serumkittet. Ved indhentning af mere data vil det blive muligt at undersøge, om der er en sammenhæng mellem S/P-værdien for de to tests.

Spyt og blodprøver indsamlet i 2019 fra 18 grisebesætninger

Prøvesvarene fra det tidligere projekt blev inddelt i tre aldersgrupper nogenlunde tilsvarende de aldersgrupper, der indgik i laboratoriesammenligningen. De blev inddelt i grise, der vejede mindre end 30 kg tilsvarende smågrise, og grise, der vejede mere end 30 kg tilsvarende slagtegrise. Derudover var der også parrede prøver fra grupper af polte.

Grise under 30 kg

Der blev medtaget data fra 11 besætninger med prøver fra 4-8 stier fra hver. I alt var der resultater fra 82 stier. Både serum- og spytprøver blev fortolket som positive, hvis S/P-værdien var lig eller over 0,4 (Tabel 3).

Tabel 3. Resultater for stier med grise under 30 kg vist som 2x2 tabel. Antal af positive og negative stier ved brug af enten spyt- eller serumprøver og testet med det tilsvarende ELISA-kit er angivet i yderste kolonne og nederste række. Tallene i midten indikerer i hvor mange tilfælde, resultatet af de to metoder stemmer overens. Spytp prøver er testet med PRRS OF ELISA-kit og serumprøver med PRRS X3 ELISA-kit og begge er fortolket med et *cut off* på 0,4.

IDEXX PRRS OF	IDEXX PRRS X3			
		Positiv	Negativ	I alt
	Positiv	22	5	27
	Negativ	1	54	55
	I alt	23	59	82

Beregnet ud fra antagelsen om, at resultatet af serumprøverne er den sande status af stierne, giver det PRRS OF ELISA-kittet en sensitivitet på 0,95 (CI95 %: 0,88 - 1,04) og en specificitet på 0,92 (CI95 %: 0,86 - 0,99) i forhold til PRRSV X3 ELISA-kittet, hvis *cut off* er ved $S/P \geq 0,4$. Overensstemmelse mellem de to tests blev udregnet til 0,83 ved Cohens kappa koefficient, hvilket tyder på en næsten perfekt overensstemmelse [14]. For at undersøge, om det var muligt at opnå en højere specificitet, uden at sensitiviteten faldt, blev prøverne vurderet igen, men med et *cut off* på $S/P \geq 1,0$ (Tabel 4).

Tabel 4. Resultater for stier med grise under 30 kg vist som 2x2 tabel. Antal af positive og negative stier ved brug af enten spyt- eller serumprøver og testet med det tilsvarende ELISA-kit er angivet i yderste kolonne og nederste række. Tallene i midten indikerer i hvor mange tilfælde, resultatet af de to metoder stemmer overens. Spytp prøver er testet med PRRS OF ELISA-kit og serumprøver med PRRS X3 ELISA-kit og begge er fortolket med et *cut off* på 1.

IDEXX PRRS OF	IDEXX PRRS X3			
		Positiv	Negativ	I alt
	Positiv	20	2	22
	Negativ	1	59	60
	I alt	21	61	82

Beregnet ud fra antagelsen om, at resultatet af serumprøverne er den sande status af stierne, giver det PRRS OF ELISA-kittet en sensitivitet på 0,96 (CI95 %: 0,87 - 1,04) og en specificitet på 0,97 (CI95 %: 0,92 - 1,01) i forhold til PRRSV X3 ELISA-kittet, når *cut off* var ved en S/P -værdi $\geq 1,0$. Overensstemmelse mellem de to tests, når *cut off* var $S/P \geq 1,0$, blev udregnet til 0,9 ved Cohens kappa koefficient, hvilket tyder på næsten perfekt overensstemmelse [14].

Grise over 30 kg

Der blev medtaget data fra 18 besætninger med prøver fra 4-8 stier fra hver. I alt var der resultater fra 104 stier. Både serum- og spytp prøver blev fortolket som positive, hvis S/P værdien var lig eller over 0,4 (Tabel 5). Beregnet ud fra antagelsen om at resultatet af serumprøverne er den sande status af stierne giver det PRRS OF ELISA-kittet en sensitivitet på 0,96 (CI95 %: 0,9 - 1,03) og en specificitet på 0,96 (CI95 %: 0,92 - 1,0) i forhold til PRRSV X3 ELISA-kittet, hvis *cut off* er ved $S/P \geq 0,4$. Overensstemmelse mellem de to tests var 0,91 udregnet ved Cohens kappa koefficient, hvilket tyder på en næsten perfekt overensstemmelse [14].

Tabel 5. Resultater for stier med grise over 30 kg vist som 2x2 tabel. Antal af positive og negative stier ved brug af enten spyt- eller serumprøver og testet med det tilsvarende ELISA-kit er angivet i yderste kolonne og nederste række. Tallene i midten indikerer i hvor mange tilfælde, resultatet af de to metoder stemmer overens. Spytp prøver er testet med PRRS OF ELISA-kit og serumprøver med PRRS X3 ELISA-kit og begge er fortolket med et *cut off* på 0,4.

IDEXX PRRS OF	IDEXX PRRS X3			
		Positiv	Negativ	I alt
	Positiv	27	3	30
	Negativ	1	73	74
	I alt	28	76	104

For at undersøge, om det var muligt at opnå en højere specificitet uden at sensitiviteten faldt, blev prøverne vurderet igen, men med et *cut off* ved $S/P \geq 1,0$ (Tabel 6).

Tabel 6. Resultater for stier med grise over 30 kg vist som 2x2 tabel. Antal af positive og negative stier ved brug af enten spyt- eller serumprøver og testet med det tilsvarende ELISA-kit er angivet i yderste kolonne og nederste række. Tallene i midten indikerer i hvor mange tilfælde, resultatet af de to metoder stemmer overens. Spytp prøver er testet med PRRS OF ELISA-kit og serumprøver med PRRS X3 ELISA-kit og begge er fortolket med et *cut off* på 1.

IDEXX PRRS OF	IDEXX PRRS X3			
		Positiv	Negativ	I alt
	Positiv	27	0	27
	Negativ	0	77	77
	I alt	27	77	104

Beregnet ud fra antagelsen om, at resultatet af serumprøverne er den sande status af stierne, giver det PRRS OF ELISA-kittet en sensitivitet på 1 (CI95 %: 1 - 1) og en specificitet på 1 (CI95 %: 1 - 1) i forhold til PRRSV X3 ELISA-kittet. Overensstemmelse mellem de to tests, når *cut off* var $S/P \geq 1,0$, blev udregnet til 1 ved Cohens kappa koefficient, hvilket tyder på perfekt overensstemmelse [14].

Polte

Der var kun seks stier med parrede serum- og spytp prøver for polte, hvoraf begge kits fik præcis samme resultat (data ikke vist).

Det parrede data fra 2019-projektet indikerede, at PRRSV OF ELISA-testen kunne detektere stier med antistofpositive grise med over 90 % i både specificitet og sensitivitet, i forhold til PRRSV X3 ELISA i alle aldersgrupper, når *cut off* var 0,4. Ved at hæve *cut off* har man i andre forsøg været i stand til at hæve specificiteten [11, 15]. Henao-Diaz et al., 2021 har foreslået, at man i overvågningssammenhænge kan hæve *cut off* værdien til 1,0 S/P [11]. Da vi anvendte den højere *cut off* værdi steg både sensitiviteten og specificiteten.

Sensitiviteten og specificiteten er i denne sammenhæng udregnet ud fra, at serum ELISA-testen (PRRSV X3 ELISA-kit) er Golden Standard. Dette er der nogle ulemper ved, da vi med dette datasæt ikke kender alle omstændighederne ved prøveudtagningen. For eksempel ved vi ikke, om serumprøverne er udtaget fra de samme grise, som har tygget i rebet. Derfor er det også muligt, at PRRSV OF ELISA-testen rent faktisk giver det korrekte svar, fx i tilfælde af, at en gris med antistoffer har tygget i rebet, men ikke har fået udtaget blod. Dette problem beskrives også i tidligere artikler, men ved sammenligning via Cohens kappa koefficient finder de tidligere undersøgelser, såvel som det ældre data med parrede prøver, en høj overensstemmelse mellem resultaterne af de to tests [8, 9, 16]. Trods uvisheden vedrørende omstændighederne for udtagelsen af prøvemateriale, er sammenligningen af de to kits ved brug af dette datasæt relevant, da vi sammenligner

sandsynligheden for at detektere en PRRSV-antistofpositiv gris i en sti baseret på stikprøver ved begge metoder.

Konklusion

Resultaterne af denne undersøgelse såvel som fra tidligere studier [5, 7, 9] tyder på, at anvendelse af spytprøver til påvisning af antistoffer mod PRRSV er lige så sensitiv og specifik som blodprøver, men anvendelse af spyt er en mindre invasiv og mindre tids- og ressourcekrævende måde at overvåge for PRRSV på. Overvågning af antistoffer mod PRRSV til fastlæggelse af PRRS-status i danske besætninger er en essentiel del af strategien for at reducere forekomsten af sygdommen. Derfor er det interessant fortsat at udvikle nye, lettere måder at indsamle prøvemateriale til antistoftests.

Referencer

- [1] Landbrug og Fødevarer S. for G.: Svineproduktion.dk, n.d.:
- [2] Landbrug og Fødevarer: (2022), STRATEGI TIL REDUKTION AF PORCIN REPRODUKTIONS-OG RESPIRATIONS-SYNDROM (PRRS) HOS GRIS I DANMARK:
- [3] Ministeriet for Fødevarer L. og F.: (2023), Bekendtgørelse om porcin reproduktions-og respirationssygdom (PRRS):
- [4] Kittawornrat A., Prickett J., Chittick W., Wang C., Engle M., Johnson J., *et al.*: (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 Res*, 154, 170–176:
- [5] Henao-Diaz A., Giménez-Lirola L., Magtoto R., Ji J., Zimmerman J.: (2019), Evaluation of three commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) oral fluid antibody ELISAs using samples of known status, *Res Vet Sci*, 125, 113–118:
- [6] Prickett J., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K.-J., Evans R.B., Zimmerman J.J.: (2008), Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions:
- [7] Fablet C., Renson P., Pol F., Dorenlor V., Mahé S., Eono F., *et al.*: (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), *Vet Microbiol*, 204, 25–34:
- [8] Graage R., Hennig-Pauka I., Arbinger H., Ritzmann M., Ladinig A.: (2019), Influence of age, group size and the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the collection of oral fluids, *Veterinary Journal*, 244, 13–15:
- [9] De Regge N., Cay B.: (2016), Comparison of PRRSV nucleic acid and antibody detection in pen-based oral fluid and individual serum samples in three different age categories of post-weaning pigs from endemically infected farms, *PLoS One*, 11:
- [10] Kuiek A.M., Ooi P.T., Yong C.K., Ng C.F.: (2015), Comparison of serum and oral fluid antibody responses after vaccination with a modified live (MLV) porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in PRRS endemic farms, *Trop Anim Health Prod*, 47, 1337–1342:
- [11] Henao-Diaz A., Zhang M., Giménez-Lirola L., Ramirez E., Gauger P., Baum D.H., *et al.*: (2021), Adapting a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) oral fluid antibody ELISA to routine surveillance, *Prev Vet Med*, 188:
- [12] IDEXX:, IDEXX PRRS OF Antibody Detection Kit Manual, n.d.:
- [13] IDEXX:, IDEXX PRRS X3 Antibody Detection Kit Manual, n.d.:

- [14] Landis J.R., Koch G.G.: (1977), The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data:
- [15] Croft E., Blackwell T., Zimmerman J.: Brief Communication Communication brève Field application of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) oral fluid antibody enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), n.d.:
- [16] Sattler T., Wodak E., Schmoll F.: (2015), Evaluation of the specificity of a commercial ELISA for detection of antibodies against porcine respiratory and reproductive syndrome virus in individual oral fluid of pigs collected in two different ways, BMC Vet Res, 11:

Projektnr.: 101452

//JAHP//

Appendiks

Appendiks A: Prøveoversigt og S/P-værdi

Tabel A1. Oversigt over prøver og første ELISA-resultater. Positive prøver med S/P>0,4 er markeret med fed skrifttype. De blå markeringer indikerer, hvilke prøver, der blev udvalgt til fortyndingsrække og opbevaringsforsøget.

ID-Nummer	SPF-status	Aldersgruppe og sti	S/P
KU-2024-101-1	Negativ	Drægtige søer 1	0,230
KU-2024-101-2	Negativ	Drægtige søer 2	0,111
KU-2024-101-3	Negativ	Drægtige søer 3	0,137
KU-2024-101-4	Negativ	Drægtige søer 4	0,097
KU-2024-101-5	Negativ	Slagtegrise 1	0,091
KU-2024-101-6	Negativ	Slagtegrise 2	0,033
KU-2024-101-7	Negativ	Slagtegrise 3	0,074
KU-2024-101-8	Negativ	Slagtegrise 4	0,048
KU-2024-101-9	Negativ	Smågrise 1	0,108
KU-2024-101-10	Negativ	Smågrise 2	0,143
KU-2024-101-11	Negativ	Smågrise 3	0,111
KU-2024-101-12	Negativ	Smågrise 4	0,215
KU-2024-98-1	PRRSV2	Drægtige søer 1	3,37
KU-2024-98-2	PRRSV2	Drægtige søer 2	3,63
KU-2024-98-3	PRRSV2	Drægtige søer 3	8,04
KU-2024-98-4	PRRSV2	Drægtige søer 4	1,11
KU-2024-98-5	PRRSV2	Slagtegrise 1	3,93
KU-2024-98-6	PRRSV2	Slagtegrise 2	4,11
KU-2024-98-7	PRRSV2	Slagtegrise 3	9,00
KU-2024-98-8	PRRSV2	Slagtegrise 4	4,30
KU-2024-98-9	PRRSV2	Smågrise 1	9,21
KU-2024-98-10	PRRSV2	Smågrise 2	9,07
KU-2024-98-11	PRRSV2	Smågrise 3	2,96
KU-2024-98-12	PRRSV2	Smågrise 4	8,67
KU-2024-105-1	PRRSV1	Drægtige søer 1	6,85
KU-2024-105-2	PRRSV1	Drægtige søer 2	7,57
KU-2024-105-3	PRRSV1	Drægtige søer 3	4,39
KU-2024-105-4	PRRSV1	Drægtige søer 4	6,06
KU-2024-105-5	PRRSV1	Slagtegrise 1	6,82
KU-2024-105-6	PRRSV1	Slagtegrise 2	7,88
KU-2024-105-7	PRRSV1	Slagtegrise 3	4,75
KU-2024-105-8	PRRSV1	Slagtegrise 4	7,36
KU-2024-105-9	PRRSV1	Smågrise 1	7,86
KU-2024-105-10	PRRSV1	Smågrise 2	5,78
KU-2024-105-11	PRRSV1	Smågrise 3	1,53
KU-2024-105-12	PRRSV1	Smågrise 4	8,19