

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kaustricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtigter schweinehaltender Betriebe

K. David¹, K. Dittmar¹, K. Heenemann², G. Reiner³, K. Donat^{1,4}

¹Thüringer Tierseuchenkasse AdöR, Tiergesundheitsdienst, Jena, Deutschland; ²Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Zentrum für Infektionsmedizin, Institut für Virologie, Deutschland; ³Justus-Liebig-Universität Giessen, Klinik für Schweine (Innere Medizin und Chirurgie), Deutschland; ⁴Justus-Liebig-Universität Giessen, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie mit tierärztlicher Ambulanz, Deutschland

Zusammenfassung

Mit Kaustricken entnommene Speichelproben haben sich in der Praxis zur Diagnose von Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) - Infektionen bewährt. Ziel dieser Studie war es, zu prüfen, ob sich mittels Speicheltupfer (Wattetupfer und GenoTube Livestock) bzw. mit Kaustricken entnommene Speichelproben auch zur Überwachung PRRSV-unverdächtigter Betriebe eignen, das heißt, um mit 95% Wahrscheinlichkeit eine Prävalenz von 20% infizierter Tiere zu entdecken.

In fünf Betrieben wurden von jeweils 12–16 Buchten durch Kaustricke entnommene Sammelspeichelproben und individuelle Speichelproben einer Stichprobe von je fünf Tieren pro Bucht untersucht. Insgesamt wurden 291 Tiere aus 58 Buchten in vier Studienbetrieben und 60 Tiere aus 12 Buchten in einem Kontrollbetrieb beprobt. Die Proben wurden dabei aus allen Alterskategorien entnommen. Als Referenzmethode für die relative Sensitivität der Speichelproben diente die Untersuchung fünf individueller Serumproben aus denselben Buchten in Anlehnung an ein bestehendes Überwachungssystem. Die Kaustrick- und Serumproben wurden mittels ELISA auf Antikörper untersucht, wobei zwei verschiedene Systeme für Serumproben verwendet wurden. Kaustricke, Speicheltupfer GenoTube Livestock und Serumproben wurden mit einer nested Reverse Transkriptase PCR sowie einem kommerziellen *real-time* Reverse Transkriptase PCR-Kit auf Virusgenom untersucht. Als Maß für die Übereinstimmung fand Cohen's Kappa Verwendung.

Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) genome fragments and antibodies in chewing ropes allow monitoring of PRRS in pig farms

Saliva samples from chewing ropes are a reliable diagnostic of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infections. The aim of this study was to test whether saliva samples taken with saliva swabs (cotton swabs and GenoTube Livestock) or with chewing ropes are suitable for monitoring PRRSV in unsuspecting farms, this means to detect a prevalence of 20% infected animals with a 95% probability.

Saliva samples were collected from 12–16 pens in five pig farms by using a chewing rope for collective samples and by individual saliva swaps from five randomly selected animals per pen. A total of 291 animals from 58 pens in four study farms and 60 animals from 12 pens in one control farm were collected. The samples were taken from all age categories. According to the current monitoring system the analysis of five individual serum samples from the same pens served as the reference method for the relative sensitivity of the saliva samples. Serum and chewing rope samples were tested by ELISA for antibodies. Two different systems were used for the serum samples. Chewing ropes, saliva swabs (GenoTube Livestock) and serum samples were examined for virus genomes using a nested reverse-transcriptase PCR and a commercial *real-time* reverse-transcriptase PCR kit. Cohen's Kappa was used as a measure of agreement.

<https://doi.org/10.17236/sat00308>

Eingereicht: 05.01.2021
Angenommen: 23.03.2021

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kaustricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtiger Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

Mit Hilfe von Kaustricken wurden in 44 Buchten, mit Hilfe von Blutserum lediglich in 34 Buchten PRRSV-Antikörper nachgewiesen. Virale RNA fand sich in 13 (Kaustrick) bzw. 16 Buchten (Serum). Speicheltupfer GenoTube Livestock zeigten eine gegenüber Serumproben geringere relative Sensitivität von 20,00%. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der Untersuchung von Serum mittels zweier Systeme war für die ELISAs sehr gut ($\kappa=0,911$), für die PCR-Systeme moderat ($\kappa=0,706$).

Der Vergleich der Kaustrickproben mit Serumproben lässt diese als geeignet zur ergänzenden Überwachung PRRSV-unverdächtiger Betriebe erscheinen. Sie können aufgrund der einfacheren Handhabung und der geringeren Untersuchungskosten zur Erhöhung der Untersuchungsfrequenz genutzt werden und damit das Überwachungssystem verbessern, stellen jedoch keine Alternative zu Serumproben dar. Die Beprobung mit Speicheltupfern ist ungeeignet.

Schlüsselwörter: Cohen's Kappa-Koeffizient, ELISA, *real-time* RT-PCR, Schweine, Sensitivität, Speichelproben

PRRSV antibodies were detected in the chewing ropes of 44 pens and in the serum samples of only 34 pens. Viral RNA was found in 13 (chewing ropes), respectively 16 pens (serum samples). Saliva swabs (GenoTube Livestock) showed a lower relative sensitivity of 20.00% compared to serum samples. The agreement of the two serum analysis was very good for the ELISAs ($\kappa=0,911$), and moderate for the PCR ($\kappa=0,706$).

The comparison of the chewing rope method with the analysis of the serum samples advocates this method as a suitable supplementary monitoring tool in PRRSV unsuspecting pig farms. Easy handling and lower examination costs of the chewing rope method allow higher testing frequency and would therefore improve the monitoring system. However, they are not an alternative to serum samples. Sampling with saliva swabs is unsuitable.

Key words: Cohen's Kappa coefficient, ELISA, *real-time* RT-PCR, pigs, sensitivity, saliva samples

Einleitung

In vom Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV)-freien Ländern^{3,4,18} und im Zuge der PRRSV-Sanierung in einzelnen Betrieben bzw. Regionen²⁵ ist eine Überwachung der PRRSV-Unverdächtigkeit Schweinehaltender Betriebe erforderlich. Die PRRSV-Unverdächtigkeit von Betrieben wurde von der Arbeitsgruppe der Schweinegesundheitsdienste so definiert, dass eine Prävalenz von 20% infizierter bzw. serumkonvertierter Tiere mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% entdeckt werden kann.¹ Ziel bei der Überwachung dieser Betriebe ist es, einen Neueintrag von PRRSV möglichst schnell zu entdecken, bevor eine weite Verbreitung des Erregers im Bestand erfolgt. Die Überwachung PRRSV-unverdächtiger Betriebe basiert in der Regel auf der Untersuchung von Blutproben.^{1,4,28} Die aufwendige zeit- und personalintensive Probenahme stellt jedoch insbesondere unter den heutigen wirtschaftlichen Bedingungen der Schweineproduktion viele Betriebe vor eine Herausforderung und es stellt sich die Frage nach alternativen Methoden der Probenahme wie etwa nach einer Überwachung mit Hilfe von Speichelproben.

Die Speichelprobenentnahme stellt in der Tiermedizin eine praktikable Möglichkeit der Probenahme dar.²⁴ Die Kaustrickdiagnostik bietet im Vergleich zur Entnahme von klassischen Blutproben eine deutliche Verbesserung des Tierwohls und der Kosteneffizienz. Im Vergleich zur Blutprobenentnahme kann auch die Entnahme von Einzeltierspeichelproben mittels Tupfer bei kleineren Tieren wie beispielsweise abgesetzten Ferkeln eine tierschonere

Probennahme darstellen. In der Schweinehaltung kommt insbesondere dem Nachweis des PRRSV im Speichel eine hohe Bedeutung zu,^{6,14,19,21,23,26} jedoch können auch andere Erreger wie das Influenza A Virus,^{2,31} das Porcine Circovirus Typ 2²² oder Antikörper gegen das Afrikanische Schweinepest-Virus¹⁷ im Speichel nachgewiesen werden.

Prickett et al. untersuchten im Jahr 2008 zum ersten Mal Speichelproben experimentell infizierter Läufer auf PRRSV.²³ Die Speichelproben wurden mittels Tupfer und Kaustrick entnommen und sowohl mit *real-time* Reverse Transkriptase (RT) PCR auf PRRSV-Genomfragmente als auch mit *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) auf Antikörper gegen PRRSV untersucht. In mehreren Studien wurde seither geprüft, mit welcher Sensitivität der Nachweis von PRRSV-Genom und spezifischen Antikörpern in Speichelproben möglich ist. Ausserdem wurden verschiedene Probenahmeprotokolle auf Praktikabilität und Reproduzierbarkeit getestet.^{6,9,11,12,14,15,26,29} In einer experimentellen Studie wurde PRRSV-RNA im Serum zwar früher, im Speichel jedoch über einen längeren Zeitraum nachgewiesen.⁶ Des Weiteren wurde beobachtet, dass bereits ein Serumantikörper-positives Tier pro Bucht zu einem positiven Ergebnis in der ELISA-Untersuchung der buchtenweise entnommenen Speichelproben führte.²⁶ Die Beprobung von Buchten mit bekannter Prävalenz brachte die Erkenntnis, dass dieses Probenmedium auch zu Zwecken des Monitorings geeignet ist.¹⁹ In einer Simulation unter Nutzung von Felddaten über die Ausbreitung des Virus innerhalb einer Herde in

verschiedenen Szenarien konnte die diagnostische Sensitivität dieses Ansatzes in Abhängigkeit von der Prävalenz innerhalb der Herde, der Anzahl der beprobten Buchten sowie der Sensitivität des verwendeten Testsystems berechnet werden.²⁷ Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl mit Kaustricken als auch mit Tupfern entnommene Speichelproben eine gute Alternative zur Detektion infizierter Herden darstellen können, jedoch bei Beprobung von wenigen Buchten in den ersten Wochen nach Einstellung in den Aufzuchtstall, geringerer Virusverbreitung im Bestand und geringer Sensitivität der Testmethode die diagnostische Sensitivität des Gesamtverfahrens deutlich unter 50% liegen kann. Daraus ergab sich die Frage, ob sich diese Modellierungsergebnisse im Praxiseinsatz bestätigen und inwieweit sich die Beprobung mit Kaustricken zur Überwachung PRRSV-unverdächtigter Betriebe eignen könnte. Ziel dieser Feldstudie war es, die Eignung von Speichelproben auch für die Detektion von PRRSV-Genomfragmenten bzw. PRRSV-spezifischen Antikörpern im Vergleich zur herkömmlichen blutserologischen Diagnostik im Praxiseinsatz zu evaluieren und daraus Empfehlungen für den Einsatz zur Überwachung PRRSV-unverdächtigter Herden abzuleiten.

Material und Methoden

Bisheriges System der Überwachung PRRSV-unverdächtigter Bestände in Thüringen

In Schweinehaltenden Betrieben in Thüringen erfolgt ein halbjährliches Monitoring auf verschiedene Krankheitserreger, unter anderem auf das PRRS-Virus. Grundlage bildet das «Programm zur Förderung der Tiergesundheit in Schweinebeständen in Thüringen»³² mit Modul 2.3 «Schutz der Schweinebestände vor Infektionen mit Viren des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndroms (PRRS)»³³ Die Häufigkeit der Beprobung und die Anzahl der Proben für das Monitoring wurden in Anlehnung an die «Verfahrensweise zur Feststellung und Überwachung der PRRS-Unverdächtigkeit von Schweinehaltenden Betrieben durch den Schweinegesundheitsdienst» festgelegt.¹ Die Richtlinie der Arbeitsgruppe fordert für Monitoringuntersuchungen in Sauenhaltungen eine halbjährliche Stichprobe, mit der eine Prävalenz von 20% infizierter bzw. serumkonvertierter Tiere mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% erkannt wird. In Sauenhaltungen ab 200 Sauen ist die Untersuchung einer Stichprobe von 14 Tieren erforderlich, bei der alle Proben ein negatives Ergebnis haben müssen. Zur Erhöhung der Sicherheit wird im Thüringer PRRS-Sanierungsprogramm gefordert, dass eine Prävalenz von 10% mit der gleichen Wahrscheinlichkeit von 95% entdeckt wird.³³ Dazu werden in jedem Betrieb zweimal im Jahr ca. 30 Blutproben genommen, verteilt auf Altsauen, Jungsaunen

und Läufer Ende des Flatdecks (sauenhaltende Betriebe) bzw. auf Masttiere unterschiedlicher Altersgruppen (Mastbetriebe), und im Tiergesundheitsdienst (TGD)-Labor Jena serologisch auf Antikörper gegen das PRRS-Virus und molekularbiologisch auf Virusgenom untersucht. Es wird der serologische Test PRRSV Ab ELISA X3 (Idexx Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) zum Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper verwendet. Zum Nachweis des Virusgenoms von PRRSV-1 und PRRSV-2 findet eine nested RT-PCR nach Mardassi,¹⁶ modifiziert nach Pesch, Verwendung.²⁰

Studienbetriebe und Probennahme

Als Studienbetriebe dienten drei Sauenhaltungen und ein Mastbetrieb, in denen in vorangegangenen Untersuchungen im Rahmen des oben genannten Tiergesundheitsprogramms PRRSV nachgewiesen wurde. Zwei dieser vier Betriebe führten seit mehreren Jahren eine bestandsweise Impfung der Sauen mit attenuiertem Lebendimpfstoff gegen das PRRS-Virus durch (Tabelle 1). Zum Zeitpunkt der Beprobung trat keine typische PRRS-Klinik in den Beständen auf. In den Betrieben wurden 750-1100 Zuchtsauen bzw. 1500 Mastschweine gehalten. Als Kontrollbetrieb wurde ein nach der Richtlinie der PRRS-Arbeitsgruppe¹ zertifiziert unverdächtig Betrieb nach gleichem Schema beprobt.

Im Rahmen des halbjährlichen serologischen Monitorings wurden in jedem Betrieb an zwei Probennahmeterminen (zweites Halbjahr 2018 und erstes Halbjahr 2019) jeweils fünf Tiere aus 12–16 Buchten durch Entnahme einer Blutprobe aus der *Vena jugularis externa* unter Verwendung eines geschlossenen Systems beprobt. Die Proben wurden in jedem Betrieb von verschiedenen Altersgruppen entnommen. Dabei handelte es sich in den sauenhaltenden Betrieben um Läufer, Jungsaunen, Altsauen und Masttiere unterschiedlichen Gewichts. In dem Mastbetrieb wurden Masttiere unterschiedlichen Gewichts beprobt. Die Buchtengröße variierte zwischen 10 und 20 Tieren. Es wurden bevorzugt Tiere ausgewählt, die leichter und kleiner waren, da diese als anfälliger für Krankheiten wie das PRRSV eingeschätzt wurden.

Tabelle 1: Informationen zu den Studienbetrieben

	Betriebsform	PRRSV-Stamm	Erstmalig nachgewiesen (Jahr)
Betrieb A	Kombinierter Betrieb	PRRSV-1 (EU-Typ)	2000
Betrieb B	Kombinierter Betrieb	PRRSV-2 (NA/US-Typ)	2011
Betrieb C	Kombinierter Betrieb	PRRSV-1 (EU-Typ)	2011
Betrieb D	Mastbetrieb	PRRSV-1 (EU-Typ)	2017
Kontrollbetrieb	Ferkelerzeuger	PRRSV-unverdächtig seit 2014	

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kaustricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtigter Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kaustricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtigter Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

Zusätzlich wurde denselben Tieren eine bzw. zwei Speicheltupferproben aus den seitlichen Backentaschen entnommen. In einem Bestand kamen neben den GenoTubes Livestock (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) auch einfache Wattestäbchen zur Anwendung, um den Speichel zu gewinnen.

Zur Gewinnung des Speichels mit Hilfe von Kaustricken wurde das Oral Fluid Collection Kit (Idexx Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) verwendet. Die Probennahme erfolgte gemäss Prickett et al.²² Die Stricke wurden vor der Einzeltierbeprobung auf Schulterhöhe der Tiere in die Buchten gehängt und für 20 bis 30 min dort belassen. Der Speichel wurde, wie vom Hersteller empfohlen, in Plastikbeutel ausgewrungen, die den Probenröhrchen direkt aufgesetzt sind, sodass der Speichel direkt in das Röhrchen abfließen kann.

Alle Proben wurden direkt in das Labor gebracht, bis zum folgenden Tag gekühlt und bei 2000 g/min für 5 min zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und anschliessend bis zur Durchführung der Tests bei $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Zum Herauslösen des Speichels aus den Speicheltupfern GenoTube Livestock wurde mit einer sterilen Schere ein Stückchen Watte abgeschnitten, das in 0,9%-ige NaCl-Lösung gegeben und eingefroren wurde. Die einfachen Wattestäbchen wurden noch am Tag der Probennahme im Labor mit 0,9%-iger NaCl-Lösung versetzt und ebenfalls bei $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Da der Vergleich der beiden Speicheltupferarten GenoTube Livestock und normale Wattetupfer im ersten beprobten Betrieb in beiden PCR-Systemen eine höhere relative Sensitivität der GenoTubes Livestock im Vergleich zur Serumprobe ergab, wurde für alle weiteren Betriebe in dieser Studie nur der Speicheltupfer GenoTube Livestock verwendet.

Der aus den Kaustricken gewonnene Speichel wurde im Labor bei 2000 g/min für 5 min zentrifugiert und bei $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Untersuchung auf PRRSV-Antikörper und PRRSV-Genom

Die Untersuchung von Serum und Speichel aus Kaustricken auf Antikörper gegen PRRSV erfolgte mit den in Tabelle 2 angegebenen Tests. Für die verwendeten Testsysteme wird vom Hersteller ein S/P-Quotient grösser oder gleich 0,4 als positiv angegeben. Eine Untersuchung der Speicheltupfer GenoTube Livestock mittels ELISA war aufgrund zu geringer Speichelmengen nicht möglich.

Für die Aufbereitung des Serums zur Durchführung der RT-PCR wurde das QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Für die Aufbereitung der Speicheltupfer GenoTube Livestock und Kaustricke wurde das QIAamp cador Pathogen Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) genutzt. Die Nukleinsäure-Extraktion erfolgte mittels des QIAcube HT (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland).

Für alle Probenmatrizes wurde neben der bisher routinemässig verwendeten nested RT-PCR nach Mardassi,¹⁶ modifiziert nach Pesch²⁰ das kommerzielle virotype PRRSV RT-PCR-Kit (Indical Bioscience, Leipzig, Deutschland) (*real-time* RT-PCR) mit dem BIO-RAD CFX96 *Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) zum Nachweis PRRSV-spezifischen Genoms eingesetzt (Tabelle 2). Neben einer Untersuchung von Einzeltierproben (Serum und Speicheltupfer) erfolgte mit beiden PCR-Systemen die Untersuchung von gepoolten Proben der fünf Tiere aus einer Bucht.

Zur näheren Charakterisierung der im Bestand verbreiteten PRRS-Viren wurde eine Sequenzierung des Genomabschnittes ORF7 aus einer positiven Probe eines jeden

Tabelle 2: Untersuchte Probenmedien mit einer Auflistung der jeweils durchgeführten Labortests

Medium		Test	Sensitivität*	Spezifität*
Serum	Antikörper-Nachweis	PRRSV Ab ELISA X3**	98,8%	99,9%
		pigtype® PRRSV Ab***	100%	100%
	Genom-Nachweis	Mardassi mod. nach Pesch (nested RT-PCR)	k. A.	k. A.
		virotype PRRSV RT-PCR-Kit*** (<i>real-time</i> RT-PCR)	95,3%	100,0%
Kaustrick	Antikörper-Nachweis	PRRSV Ab ELISA OF**	100%	98,7%
	Genom-Nachweis	Mardassi mod. nach Pesch (nested RT-PCR)	k. A.	k. A.
		virotype PRRSV RT-PCR-Kit*** (<i>real-time</i> RT-PCR)	95,3%	100,0%
Speicheltupfer Geno-Tube Livestock/ Wattetupfer	Genom-Nachweis	Mardassi mod. nach Pesch (nested RT-PCR)	k. A.	k. A.
		virotype PRRSV RT-PCR-Kit*** (<i>real-time</i> RT-PCR)	95,3%	100,0%

*Herstellerangaben; **Idexx Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA, ***Indical Bioscience, Leipzig, Deutschland; k. A. keine Angaben

Tabelle 3: Übereinstimmung der Ergebnisse der verwendeten ELISA-Testsysteme PRRSV Ab ELISA X3 und pigtype® PRRSV Ab für Serum zum Nachweis von PRRSV-spezifischen Antikörpern auf Einzeltierebene

		PRRSV Ab ELISA X3 (Serum)			Cohen's Kappa	Signifikanz
		positiv	negativ	gesamt		
pigtype® PRRSV Ab (Serum)	positiv	136	8	144	0,911	p < 0,001
	negativ	5	142	147		
	gesamt	141	150	291		

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kastricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtigter Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

Bestands zur Bestätigung der Virusnachweise durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das PCR-Produkt der nested RT-PCR mittels GeneJET™ Gel Extraction und Mikro-Kit (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) aufgereinigt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger (Microsynth AG, Balgach, Schweiz). Die übermittelte Nukleotidsequenz wurde nachfolgend mittels GENtle (Magnus Manske, Universität Köln) analysiert und mit hinterlegten Sequenzen in der Datenbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologie-Informationen (*National Center for Biotechnology Information* [NCBI]), abgeglichen.

Statistische Auswertung

Die Erfassung der Untersuchungsergebnisse erfolgte in der Laborsoftware des TGD-Labors und die Aufbereitung der Daten erfolgte mithilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Für Berechnungen wurde die Statistiksoftware SPSS für Windows (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) verwendet.

Zur Auswertung auf Buchtenebene galt eine Bucht als negativ, wenn alle fünf beprobten Tiere im jeweiligen Testsystem negativ getestet wurden. Sobald ein Tier im auszuwertenden Testsystem ein positives Ergebnis hatte, galt die gesamte Bucht als positiv.

Die für diese Studie verwendeten Tests wurden anhand der relativen Sensitivität zu den bisher zur Überwachung der Bestände verwendeten Testsystemen verglichen. Zur Berechnung der *Likelihood Ratio* wurde die hier berechnete relative Sensitivität und die vom Hersteller des Tests

angegebene Spezifität verwendet. Die prädiktiven Werte wurden anhand der Stichprobenprävalenz und der vom Hersteller der Testsysteme angegebenen Spezifität berechnet. Ausserdem wird Cohen's Kappa-Koeffizient (κ) als Mass der Übereinstimmung zwischen den Testsystemen angegeben. Folgende Richtwerte wurden zu dessen Interpretation angewandt:¹³ <0,20: schwache Übereinstimmung; 0,21–0,40: leichte Übereinstimmung; 0,41–0,60: moderate Übereinstimmung; 0,61–0,80: gute Übereinstimmung; 0,81–1,00: sehr gute Übereinstimmung.

Resultate

Im PRRSV-unverdächtigen Kontrollbetrieb wurden insgesamt 60 Tiere aus 12 Buchten untersucht. Alle mit den unterschiedlichen Verfahren entnommenen Proben waren bei Untersuchung in den verschiedenen Testsystemen bis auf eine Ausnahme negativ: Ein Tier hatte in der *real-time* RT-PCR einen positiven Befund für PRRSV Typ 1 (EU-Typ, Ct-Wert: 33,5). Eine Wiederholung der Untersuchung mit dem kommerziellen VetMax PRRSV EU&NA 2.0 Kit (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) ergab ein negatives Ergebnis. Da ausserdem keines der anderen Testsysteme für diese Probe ein positives Ergebnis zeigte und der Betrieb in vorausgegangenen und nachfolgenden Bestandsuntersuchungen ebenfalls ausschliesslich negative Ergebnisse hatte, wurde dieses einzelne Ergebnis als «falsch positiv» gewertet.

Antikörper-Nachweis

In den Studienbetrieben wurden insgesamt 291 Tiere aus 58 Buchten beprobt. In den beiden ELISA-Testsys-

Tabelle 4: Anzahl positiver und negativer Buchten im PRRSV Ab ELISA OF für aus Kastricken gewonnenen Speichel zum Nachweis von PRRSV-spezifischen Antikörpern mit der Sensitivität im Vergleich zum bisher verwendeten PRRSV Ab ELISA X3 für buchtenweise zusammengefasste Serumproben (Bucht ist positiv, wenn mind. 1 Tier positiv) sowie die Übereinstimmung der Ergebnisse angegeben durch Cohen's Kappa

		PRRSV Ab ELISA X3 (Serum)				Likelihood Ratio (LR)		Prädiktive Werte (PW)*		Cohen's Kappa	Signifikanz
		positiv	negativ	gesamt	Sensitivität	LR+	LR-	PW+	PW-		
PRRSV Ab ELISA OF (Kau- strick)	positiv	32	12	44	94,12	72,4	0,1	0,941	0,478	0,451	p < 0,001
	negativ	2	11	13							
	gesamt	34	23	57							

*berechnet anhand der Stichprobenprävalenz

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kaustricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtigter Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

temen für Serum zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung ($\kappa=0,911$; $p<0,001$) zwischen den Tests (Tabelle 3). Die Übereinstimmung auf Buchtenebene zwischen dem PRRSV Ab ELISA OF für Speichel aus Kaustricken und dem bisher eingesetzten PRRSV Ab ELISA X3 für Serum war moderat ($\kappa=0,451$; $p<0,001$). Die relative Sensitivität des ELISA unter Verwendung der Kaustricke war im Vergleich zur bisher verwendeten

Methode des Antikörpernachweises im Blutserum mit 94,12% gut. Es wurden zudem mittels der Kaustricke 12 Buchten als positiv detektiert, die in der Stichprobenuntersuchung auf Serumantikörper negativ waren. Umgekehrt wurden zwei Buchten mittels Serum als positiv detektiert, die in der Untersuchung der Kaustricke negativ waren (Tabelle 4).

Tabelle 5: Relative Sensitivität der nested RT-PCR von GenoTube-Proben im Vergleich zur nested RT-PCR der Serumproben auf Einzeltierebene sowie die Übereinstimmung der Ergebnisse angegeben durch Cohen's Kappa

		nested RT-PCR (Serum)				Prädiktive Werte (PW)*		Cohen's Kappa	Signifikanz
		positiv	negativ	gesamt	Sensitivität	PW+	PW-		
nested RT-PCR (Speicheltupfer GenoTube Livestock)	positiv	6	5***	11	20,00	0,200	0,978	0,246	$p<0,001$
	negativ	24**	224	248					
	gesamt	30	229	259					

*berechnet anhand der Stichprobenprävalenz; **davon 3 Proben positiv für PRRSV-2 (NA/US-Typ); ***davon 2 Proben positiv für PRRSV-2 (NA/US-Typ)

Tabelle 6: Relative Sensitivität der *real-time* RT-PCR von Serum- und GenoTube-Proben im Vergleich zur nested RT-PCR der Serumproben auf Einzeltierebene sowie die Übereinstimmung der Ergebnisse angegeben durch Cohen's Kappa

		nested RT-PCR (Serum)				Prädiktive Werte (PW)*		Cohen's Kappa	Signifikanz
		positiv	negativ	gesamt	Sensitivität	PW+	PW-		
<i>real-time</i> RT-PCR (Serum)	positiv	37	14	51	78,72	0,787	0,943	0,706	$p<0,001$
	negativ	10**	232	242					
	gesamt	47	246	293					
<i>real-time</i> RT-PCR (Speicheltupfer GenoTube Livestock)	positiv	11	4	15	36,67	0,367	0,982	0,445	$p<0,001$
	negativ	19**	221	240					
	gesamt	30	225	255					

*berechnet anhand der Stichprobenprävalenz; **davon 3 Proben positiv für PRRSV-2 (NA/US-Typ)

Tabelle 7: Anzahl positiver und negativer Ergebnisse der nested RT-PCR und *real-time* RT-PCR der buchtenweise gepoolten Serum- und GenoTube-Proben mit Sensitivität im Vergleich zu den jeweiligen buchtenweise zusammengefassten Einzelproben sowie die Übereinstimmung der Ergebnisse angegeben durch Cohen's Kappa

		Einzelproben			Sensitivität	Prädiktive Werte (PW)*		Cohen's Kappa	Signifikanz	
		positiv	negativ	gesamt		PW+	PW-			
Serum Ser-Pool	nested RT-PCR	positiv	14	1	87,50	0,875	0,976	0,868	$p<0,001$	
		negativ	2	41						43
		gesamt	16	42						58
	<i>real-time</i> RT-PCR	positiv	16	2	84,21	0,842	0,949	0,802	$p<0,001$	
		negativ	3	37						40
		gesamt	19	39						58
Speicheltupfer GenoTube Livestock Ser-Pool	nested RT-PCR	positiv	2	0	33,33	0,333	1,000	0,47	$p<0,001$	
		negativ	4	47						51
		gesamt	6	47						53
	<i>real-time</i> RT-PCR	positiv	3	0	30,00	0,700	1,000	0,409	$p<0,001$	
		negativ	7	42						49
		gesamt	10	42						52

*berechnet anhand der Stichprobenprävalenz

Virusgenom-Nachweis

Auf Einzeltierebene zeigte sich bei der Untersuchung von Serumproben auf PRRSV-Genom eine gute Übereinstimmung der *real-time* RT-PCR mit der nested RT-PCR ($\kappa=0,706$; $p<0,001$). Die Übereinstimmung der Ergebnisse der nested RT-PCR der Serumproben mit den Ergebnissen der Untersuchung der Speicheltupfer GenoTube Livestock war je nach Test unterschiedlich: Die Übereinstimmung mit der nested RT-PCR war leicht ($\kappa=0,246$; $p<0,001$) und mit der *real-time* RT-PCR moderat ($\kappa=0,445$; $p<0,001$) (Tabellen 5 und 6).

Unabhängig vom Untersuchungsmaterial war in beiden PCR-Systemen die Testung von Einzelproben sensitiver als eine Untersuchung eines Pools von fünf Proben, wobei die Übereinstimmung zwischen Einzelproben und gepoolten Serumproben höher war als die zwischen Einzelproben und gepoolten Speicheltupfern GenoTube Livestock. Bei diesen war die Übereinstimmung bei Untersuchung mit der nested RT-PCR geringfügig höher als bei Applikation der *real-time* RT-PCR (Tabelle 7).

Auf Buchtenebene ergab sich eine ähnlich geringe Übereinstimmung der Ergebnisse aus der Untersuchung der mittels Speicheltupfern GenoTube Livestock oder Kastrick entnommenen Speichelproben mit Serumproben bei Anwendung der nested RT-PCR. Bei Zusammenfassung der Einzelproben einer Bucht zu einem für die Bucht geltenden Ergebnis, bei der ab einem positiven Tier die Bucht als positiv galt, erhöhte sich die relative Sensitivität der GenoTubes Livestock auf 33,33% im Vergleich zu den Serumproben bei einer Übereinstimmung von $\kappa=0,346$. Die relative Sensitivität der Kastrick-Proben lag mit 50,00% über der der GenoTubes Livestock. Ausserdem hatten fünf im Serum negative Buchten in der mittels Kastrick entnommenen Speichelprobe in der nested RT-PCR ein positives Ergebnis (Tabell 8).

Die Übereinstimmung der drei mittels *real-time* RT-PCR untersuchten Probenmatrizes auf Buchtenebene zu den mittels nested RT-PCR untersuchten Serumproben war für die Speicheltupfer GenoTube Livestock und Kastricke moderat mit $\kappa=0,542$ ($p<0,001$) für GenoTubes Livestock bzw. $\kappa=0,581$ ($p<0,001$) für

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kastricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtiger schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

Tabelle 8: Anzahl positiver und negativer Buchten der mittels nested RT-PCR untersuchten Speichelproben (GenoTube Livestock und Speichel aus Kastricken) mit Sensitivität im Vergleich zur nested RT-PCR der Serumproben auf Buchtenebene sowie die Übereinstimmung der Ergebnisse angegeben durch Cohen's Kappa (Bucht ist positiv, wenn mind. 1 Tier positiv)

		nested RT-PCR (Serum)			Sensitivität	Prädiktive Werte (PW)*		Cohen's Kappa	Signifikanz
		positiv	negativ	gesamt		PW+	PW-		
nested RT-PCR (Speicheltupfer GenoTube Livestock)	positiv	4	2**	6	33,33	0,333	0,951	0,346	p=0,006
	negativ	8**	39	47					
	gesamt	12	41	53					
nested RT-PCR (Kastrick)	positiv	8	5**	13	50,00	0,500	0,878	0,401	p=0,002
	negativ	8**	36	44					
	gesamt	16	41	57					

*berechnet anhand der Stichprobenprävalenz; **davon 1 Bucht positiv für PRRSV-2 (NA/US-Typ)

Tabelle 9: Anzahl positiver und negativer Buchten der drei Probenmedien Serum, GenoTube Livestock und Speichel aus Kastricken in der *real-time* RT-PCR mit Sensitivität im Vergleich zur nested RT-PCR der Serumproben auf Buchtenebene sowie die Übereinstimmung der Ergebnisse angegeben durch Cohen's Kappa (Bucht ist positiv, wenn mind. 1 Tier positiv)

		nested RT-PCR (Serum)			Sensitivität	Prädiktive Werte (PW)*		Cohen's Kappa	Signifikanz
		positiv	negativ	gesamt		PW+	PW-		
<i>real-time</i> RT-PCR (Serum)	positiv	13	6	19	81,25	0,813	0,860	0,636	p<0,001
	negativ	3**	37	40					
	gesamt	16	43	59					
<i>real-time</i> RT-PCR (Speicheltupfer GenoTube Livestock)	positiv	7	3	10	58,33	0,583	0,927	0,542	p<0,001
	negativ	5**	38	43					
	gesamt	12	41	53					
<i>real-time</i> RT-PCR (Kastrick)	positiv	12	6	18	75,00	0,750	0,854	0,581	p<0,001
	negativ	4**	35	39					
	gesamt	16	41	57					

*berechnet anhand der Stichprobenprävalenz; **davon 1 Bucht positiv für PRRSV-2 (NA/US-Typ)

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kastricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtiger Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

Kastricke und gut für Serumproben mit $\kappa=0,636$ ($p<0,001$) (Tabelle 9).

Unabhängig vom Probenmedium wurde mit der *real-time* RT-PCR in keiner der Proben PRRSV Typ 2-Genom (NA/US-Typ) nachgewiesen. Dagegen zeigte sich bei der nachfolgenden Sequenzierung einzelner Proben, dass lediglich in den Betrieben A, C, und D ausschliesslich PRRSV-1 (EU-Typ) gefunden wurde, jedoch in Betrieb B PRRSV-2 (NA/US-Typ) vorlag. Dies stimmte mit den Befunden aus Untersuchungen der zurückliegenden Jahre überein. Eine Sequenzierung viraler RNA aus Betrieb A zeigte eine Homologie des ORF7 zu 97% sowohl zu einem bekannten PRRSV-1 Feldstamm als auch einem PRRSV-1 Impfstamm. Die RNA aus Betrieb B war zu 97% zu einem bekannten PRRSV-2 Feldstamm und zu 96% zu einem PRRSV-2 Impfstamm homolog. Der sequenzierte Genomabschnitt aus Betrieb C ergab eine Homologie zu 100%, der aus Betrieb D eine Homologie zu 99% zu einem PRRSV-1 Impfstamm. In den als Referenz verwendeten Serumproben in der nested RT-PCR lag die Stichprobenprävalenz im Mittel bei $16,0 \pm 36,8\%$. In der *real-time* RT-PCR lag die Stichprobenprävalenz bei $17,41 \pm 38,0\%$.

Diskussion

Ziel dieser Studie war es zu prüfen, ob sich auf zwei verschiedene Arten genommene Speichelproben zur Überwachung PRRSV-unverdächtiger Betriebe eignen um daraus Empfehlungen zum Einsatz dieses diagnostischen Verfahrens zur Überwachung PRRSV-unverdächtiger Schweinebestände abzuleiten. Dabei wurden verschiedene Testsysteme für jedes Probenmedium verwendet. Als Referenzmethode für die Untersuchung von Speichelproben diente das bestehende Überwachungssystem mittels Blutproben, wobei Serumproben von fünf Tieren je Bucht entnommen wurden. Da die individuell entnommenen Serumproben eine kleinere Stichprobe umfassen als die Kastrickproben, ist die Vergleichbarkeit von vornherein limitiert. Trotz dieser Einschränkung sollten die beiden Probenmatrizes hinsichtlich der Detektion von PRRSV-Genomfragmenten bzw. PRRSV-spezifischen Antikörpern auf Buchtenebene verglichen werden. Da für die Untersuchungen auf PRRSV-Antikörper und -Genom kein echter Goldstandard zur Verfügung steht, mussten Sensitivität und Übereinstimmung der Kastrickergebnisse auf die Ergebnisse der Serumproben bezogen werden. Zur Bewertung von Speichelproben zum Nachweis von PRRSV-Genom bzw. -Antikörpern liegen bereits zahlreiche Studien vor.^{2,5,6,9,11,12,23,19,14,15,16,22,29} Bislang fehlten jedoch Informationen zur Eignung solcher Proben für die Überwachung unverdächtiger Betriebe unter Feldbedingungen. Hier setzte die vorliegende Studie an.

Beim Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper zeigte sich, dass mit Kastricken 44 Buchten als positiv detektiert wurden, von denen mit der bisherigen Methode jedoch nur 32 entdeckt wurden. Bis auf zwei Buchten wurde jede im Serum positive Bucht auch mit Kastricken detektiert, woraus eine relative Sensitivität für die Kastricke von 94,12% resultierte. In einer anderen Studie war in Buchten mit nur einem serologisch positiven Tier auch die mittels Kastrick entnommene Speichelprobe positiv.²⁶ Die moderate Übereinstimmung zwischen dem Antikörper-Test der Serumproben und der Kastricke kann damit erklärt werden, dass in den zwölf mittels Serumproben negativ getesteten Buchten vermutlich auch PRRSV-positive Tiere vorkamen, die nicht in die serologische Stichprobe einbezogen waren. Sofern diese mit dem Kastrick erfasst wurden, resultierte daraus ein positives Ergebnis der Kastrickprobe. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Buchtengrösse einen Einfluss auf den Anteil involvierter Tiere haben kann.¹⁰ Auch wenn nicht immer alle Tiere einer Bucht den Kastrick annehmen, ist bei einer Beprobung mittels Kastricken in der Regel ein hoher Anteil der Tiere einer Bucht einbezogen, was bei einer individuellen Beprobung mit Blutproben bzw. Speicheltupfern nur unter grossem Aufwand und grosser Belastung für die Tiere möglich wäre. Somit war durch die buchtenweise mit Kastricken entnommenen Speichelproben die Beprobung einer deutlich grösseren Anzahl von Tieren mit geringerem Zeit- und Kostenaufwand möglich. Hieraus erwächst insbesondere ein Vorteil für das Screening bis dahin unverdächtiger Betriebe mit frischem Viruseintrag und damit einhergehender niedriger Prävalenz. Je mehr Tiere beprobt werden können, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Eintrag zeitnah bemerkt wird. Die einfache Handhabung von Kastricken und die Einbeziehung eines grossen Teils der Buchtenmitglieder lassen sich auch für Monitoring-Programme mit hoher Beprobungsfrequenz zielführend einsetzen.

Unterschiede im Testergebnis könnten auch auf das Vorkommen verschiedener potentiell mit den Tests interagierender Bestandteile im Speichel, wie bestimmter Enzyme und anderer Proteine, diverser Antikörper, Futterbestandteile und anderer Stoffe, die im Serum nicht zu finden sind, erklärt werden.³⁰ Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass diese Proben testbedingt falsch positiv waren. Bei einer Testspezifität nach Herstellerangaben von 99,9% (PRRSV Ab ELISA X3 für Serum) wäre die Wahrscheinlichkeit dafür mit ca. 0,1% zu beziffern. Die Spezifität des verwendeten ELISAs für Kastricke liegt mit 98,7% darunter.

Bezüglich des Nachweises von Virusgenom ergeben sich weitere Unterschiede zwischen Speichel- und Serumproben. Im Speichel sind anders als im Blut oder Serum Ribonucleasen vorhanden, die in der Zeit bis zum Ein-

gefrieren der Probe das Virusgenom zerstören können.^{7,21} Auch an gefrorenen Proben wurde eine Abnahme der Genommenge über die Zeit festgestellt.³⁴ Dies kann dazu führen, dass bei einer längeren Probenlagerung die Menge des Virusmaterials unter die Nachweisgrenze sinkt, ein Aspekt, der auch während der Probenbearbeitung im Labor zum Tragen kommen kann.⁵ Daher müssen Speichelproben im Vergleich zu Serumproben als anfälliger gegenüber einer längeren Probenlagerung angesehen werden. Um die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf Praxisbedingungen zu gewährleisten, wurden abgesehen von einem zügigen Transport der Proben zum Labor keine weiteren Vorkehrungen getroffen (z. B. Kühlung, Transport auf Eis), die sich unter Feldbedingungen kaum realisieren lassen.

Neben der grösseren Sensibilität von Speichel für das Handling von der Probennahme bis zur Untersuchung wird die Vergleichbarkeit von Speichel- und Serumproben ebenfalls dadurch beeinträchtigt, dass das Virusgenom nicht zeitgleich in Serum und Speichel nachweisbar ist. Virusmaterial kann im Serum nach einer Infektion früher nachgewiesen werden. Eine Ausscheidung über den Speichel ist aber noch möglich, wenn es im Serum bereits nicht mehr nachweisbar ist.⁶ Während ein bis zwei Wochen nach einer Infektion die Nachweisrate von PRRSV-spezifischer RNA im Serum sinkt, steigt sie im gleichen Zeitraum im Speichel an.¹¹ Insbesondere in sauenhaltenden Betrieben und Mastbetrieben wird mit einem halbjährlichen Überwachungsrythmus gearbeitet.¹ Bei diesem Untersuchungsrythmus ist es unwahrscheinlich, dass eine Neuinfektion frühzeitig durch Virusnachweis entdeckt wird. Wahrscheinlicher ist es, dass eine Neuinfektion zu einem unbekanntem Zeitpunkt während der etwa sechsmonatigen Phase zwischen zwei Untersuchungen stattfindet und bei der nächsten Kontrolluntersuchung durch positive Antikörperbefunde nachgewiesen wird. Eine engmaschigere Überwachung der Betriebe durch Speichel- anstatt Serumproben könnte mithelfen, den Zeitraum zwischen Neuinfektion und Entdeckung zu reduzieren. Die frühere Nachweismöglichkeit einer Neuinfektion mittels Serumproben gegenüber Speichelproben dürfte vor dem Hintergrund der einfacheren Umsetzbarkeit von Speichelproben an Bedeutung verlieren. Der Ersatz von Blutproben durch buchtenweise gewonnene Speichelproben könnte Tierarzt, Landwirt und Tiere gleichermaßen entlasten.

Im Vergleich zwischen einer Beprobung mittels Kastricken und Speicheltupfern erwiesen sich letztere unabhängig von der Art der Speicheltupfer und der PCR-Methode als weniger geeignet zum Nachweis von Virusgenom. In einer Voruntersuchung wurde bereits anhand von 55 Proben der herkömmliche Wattetupfer als weniger sensitiv als der Speicheltupfer GenoTube

Livestock identifiziert. Auch die Beprobung aller weiteren Tiere mittels GenoTube Livestock ergab jedoch keine gute Übereinstimmung mit den Serumproben. Anders als bei den Kastricken hatten nur wenige der im Serum in der nested RT-PCR negativen Tiere einen positiven Nachweis in der mit Tupfer entnommenen Speichelprobe (Tabelle 5 und 6). Damit fiel die relativ zur Serumprobe ermittelte Sensitivität der Speicheltupferproben im Vergleich zur Kastrickprobe erheblich ab (Tabelle 8 und 9). Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von Prickett et al.²³ und lassen den Einsatz von Speicheltupfern zum Nachweis von PRRSV-Genom zum Zweck der Überwachung PRRSV-unverdächtigter Betriebe als eher ungeeignet erscheinen.

Die beiden parallel an den Serumproben durchgeführten serologischen Antikörpertests zeigten eine gute Übereinstimmung. Somit können beide Testverfahren gleichermaßen zur Untersuchung auf PRRSV-spezifische Antikörper eingesetzt werden. Beim Vergleich der beiden eingesetzten ELISAs zeigte sich, dass auch bei Serumproben grundsätzlich das Risiko falsch positiver Proben besteht. Die Übereinstimmung ist mit Cohen's Kappa von 0,911 sehr gut, aber nicht vollständig. Unterschiede zwischen den ELISAs bestanden nur bei etwa 1% der untersuchten Proben. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Testergebnisse der beiden PCR-Systeme deutlich. Das mit der *real-time* RT-PCR positive Ergebnis einer Serumprobe des unverdächtigen Betriebs für PRRSV Typ 1 (EU-Typ) kann ein Indiz für eine begrenzte Spezifität dieses Verfahrens sein.

Um die Kosten für die PCR-Untersuchung von Proben zu reduzieren, ist die Untersuchung gepoolter Proben, meist mit fünf Einzelproben in einem Pool, in der Praxis verbreitet. Nur bei einem positiven Ergebnis wird bei Bedarf (zum Beispiel zur Sequenzierung des Virusgenoms) im Anschluss eine Einzeluntersuchung der Proben durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die Poolproben tatsächlich eine ausreichende Übereinstimmung mit den Einzelproben haben, wurden alle von Einzeltieren genommenen Proben aus einer Bucht zusätzlich zur Einzeluntersuchung zu Pools à fünf Einzeltierproben zusammengefasst. Bei der Poolung der vom Einzeltier genommenen Serumproben und Speicheltupfer GenoTube Livestock zeigte sich eine höhere Genauigkeit der Einzelproben. Poolproben mit ein oder zwei positiven Einzelproben führten häufig zu einem negativen Ergebnis; wahrscheinlich ein Effekt der Verdünnung der verfügbaren RNA-Menge unter die Nachweisgrenze. Andererseits gab es in beiden PCR-Systemen auch positive Poole, obwohl alle Proben in der Einzeluntersuchung negativ waren. Für diesen Effekt dürften geringfügige Ungleichverteilungen an Virusgenom in den jeweiligen Proben an der Nachweisgrenze verantwortlich sein. In einer Studie, in der neben einer Poolung von Proben

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kastricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtigter Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kastricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtiger Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

drei verschiedene *real-time* RT-PCR-Kits verglichen wurden, zeigte sich in allen Kits eine gute Übereinstimmung der Poolproben mit den Einzelproben solange eine hohe Viruslast vorlag.¹¹ Aus diagnostischer Sicht sollte daher in wichtigen Fällen wie bei Abklärungsuntersuchungen zur Überwachung PRRSV-unverdächtiger Betriebe mit der Untersuchung von Einzelproben gearbeitet werden, auch wenn dies höhere Untersuchungskosten mit sich bringt.

Im Unterschied zur eingesetzten *real-time* RT-PCR zeigten die Ergebnisse der Sequenzierung einzelner Proben in ORF7, dass in einem der Bestände auch PRRSV-2 verbreitet war, was mit den Ergebnissen aus vergangenen Jahren übereinstimmte. Zudem wurden beachtliche Homologien zu Impfstoffen festgestellt, zum Teil bis zu 100%. Die Ergebnisse der Sequenzierung von ORF7 deuten darauf hin, dass es sich in den Studienbetrieben A und B eher um eine Belastung mit Feldvirus handelte, da die Übereinstimmung mit Impfvirusstämmen unter 98% lag.⁸ Damit entspricht die Zusammensetzung unserer Studienpopulation in etwa den in der Region Thüringen beobachteten Praxisverhältnissen mit einem geringeren Vorkommen von PRRSV-2 und einem beachtlichen Anteil an Impfvirusverbreitung (nicht veröffentlichte eigene Daten). Damit können die Ergebnisse dieser Studie auf Betriebe der Region gut übertragen werden, müssen jedoch für Regionen mit starker Verbreitung von PRRSV-2 vorsichtig interpretiert werden.

Die Stichprobe für diese Studie wurde an ein bestehendes Überwachungssystem angepasst, bei dem halbjährlich mindestens 30 Einzeltierproben genommen werden,³³ meist als sechs Gruppen zu je fünf Tieren. In dieser Studie waren die in die Stichprobe einbezogenen Tiere so auf die Buchten aufgeteilt, dass eine Vergleichbarkeit mit einer buchtenweise entnommenen Speichelprobe gegeben war. Diese Verteilung führte dazu, dass in jedem Bestand bei zwei Beprobungsdurchgängen mindestens zwölf Sammelspeichelproben genommen wurden. Bei einer Herdengröße von 1000 Sauen genügen 29 Einzeltierproben um mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% eine Prävalenz von 10% zu erkennen. Diese Probenzahl ist vergleichbar mit der halbjährlichen Stichprobengröße der vorliegenden Studie. Aufgrund der schnellen Ausbreitung des Virus innerhalb von Beständen ist es zu erwarten, dass bei einer PRRSV-Neuinfektion die Prävalenz zum Zeitpunkt der Untersuchung mindestens 10% beträgt und durch die verwendete Stichprobe mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% entdeckt würde. Dennoch hat sich die Arbeitsgruppe PRRS der Schweinegesundheitsdienste darauf verständigt, nach diesen Grundsätzen überwachte Betriebe nicht als «PRRSV-frei» zu bezeichnen, da eine statistische Restunsicherheit von 5% besteht, die Infektion nicht zu entdecken.

Die in der vorliegenden Studie genommenen Proben wurden allerdings nicht zufällig auf die Herde verteilt, sondern bestimmte Bereiche (Buchten) wurden gezielt ausgewählt beprobt. Dafür wurden die Tiergruppen ausgewählt, in denen das grösste Risiko einer PRRSV-Verbreitung vermutet wurde. Deshalb muss berücksichtigt werden, dass bei Viruseintrag in andere Tiergruppen auch bei einer Prävalenz von 10% der Viruseintrag nur mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit entdeckt worden wäre. Für eine höhere Sicherheit bei der Überwachung der Unverdächtigkeit wäre eine grössere Mindestprobenzahl empfehlenswert.²⁷ Beim Einsatz serologischer Untersuchungen sind dieser Erhöhung aus Gründen des Zeit- und Kostenaufwands Grenzen gesetzt, bei einer Beprobung mit Kastricken würden sich jedoch die Zahl der in die Beprobung einbezogenen Tiere und die Untersuchungsfrequenz erhöhen lassen. Das ist insbesondere dann wichtig, wenn in einem Umfeld mit höherer Schweinedichte oder höherem Infektionsdruck bezüglich PRRSV ein PRRSV-unverdächtiger Bestand zu überwachen ist.

Gute Nachweisraten insbesondere PRRSV-spezifischer Antikörper bei praxisnaher Probenbehandlung (z. B. weder Zentrifugation vor Ort, noch gekühlter Transport zum Labor) bestätigen die gute Eignung von Kastricken zur Untersuchung und Überwachung des PRRSV-Status von Betrieben auch mit niedriger PRRSV-Prävalenz. Die Methode zeigt erhebliche arbeitstechnische Vorteile, weil keine zweite Person zum Festhalten der Tiere notwendig ist und besticht auch aus Sicht des Tierschutzes gegenüber invasiven Beprobungen. Die Erfassung mehrerer Tiere je Bucht verbessert bei geringerer Probenzahl den Überblick über die Bestandssituation. Die Kosten für die Probenahme und die Untersuchung der Proben können somit begrenzt werden. Insgesamt dürften diese Vorteile der Kastrick-Proben zu einer steigenden Bereitschaft der Landwirte führen, die PRRSV-Untersuchung häufiger durchführen zu lassen.

Ein grundsätzliches Risiko falsch positiver Ergebnisse in Betrieben mit dem Status «PRRSV-unverdächtig» besteht, kann jedoch durch Abklärungsuntersuchungen beherrscht werden. In diesem Fall würde ein Zertifikat der PRRSV-Unverdächtigkeit für den betreffenden Betrieb so lange ausgesetzt, bis eine Abklärungsuntersuchung mit negativem Ergebnis stattgefunden hat.¹ Für den Fall eines positiven Ergebnisses bei Untersuchung einer Sammelspeichelprobe wäre dies möglich, indem beispielsweise Blutproben einer angemessenen Stichprobe von Tieren aus der fraglichen Bucht sowie den Kontaktbuchten untersucht wird.

Zukünftige Studien sollten die Allgemeingültigkeit der vorgestellten Ergebnisse überprüfen, insbesondere hin-

sichtlich der Werte für die Sensitivität und Spezifität des Untersuchungsansatzes. Die momentan geübte Praxis der Zertifizierung von PRRSV-unverdächtigen sauehaltenden Betrieben und Mastbetrieben über eine zweimal im Jahr stattfindende Untersuchung mittels Blutproben¹ könnte mit Hilfe von Kaustricken in eine engmaschigere Überwachung überführt werden, bei der sich die Diagnostik aus Serumproben und aus Kaustricken auf sinnvolle Weise ergänzen.

Schlussfolgerung

Mit dem Einsatz von Kaustricken lassen sich bei geringerem Arbeitseinsatz und schonendem Umgang mit den Tieren eine engmaschigere Überwachung PRRSV-unverdächtiger Betriebe sowie die Vorbereitung und Begleitung von Betriebsanierungen unterstützen und realisieren. Insbesondere zum Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper sind auch bei praxisnaher Probenbehandlung Kaustricke gut anwendbar. Die Methodik ist geeignet, einen wertvollen Beitrag zur Bekämpfung von PRRS in Schweinebeständen zu leisten, ohne die Diagnostik aus Serumproben vollständig ersetzen zu können. Bei Abklärungsuntersuchungen zur Überwachung PRRSV-unverdächtiger Betriebe und sofern eine geringe Viruslast erwartet wird, sollte bei der Untersuchung von Blutproben auf Virusgenom mit Einzelproben gearbeitet werden.

Erklärung zum Interessenskonflikt

Karsten Donat ist Geschäftsführer der Thüringer Tierseuchenkasse, deren Schweinegesundheitsdienst das PRRSV-Programm in Thüringen koordiniert und teil-

weise finanziert und deren TGD-Labor die Untersuchungen im Rahmen dieses Programms durchführt. Die Autoren erklären, dass keine weiteren Interessenskonflikte finanzieller aber auch in konsultatorischer Hinsicht bestehen, welche durch die Publikation des Manuskriptes beeinflusst werden könnten.

Erklärung zum Tierschutz

Die Autoren erklären, dass das Projekt «Vergleichsuntersuchung verschiedener Labormethoden zur Diagnostik von PRRSV und PRRSV-Antikörpern» von der zuständigen Behörde geprüft wurde (Az. 2684-04-15-TSK-18-002) und diese zum Ergebnis kam, dass das Projekt nicht als Tierversuch einzustufen ist.

Danksagung

Die Autoren danken der Thüringer Tierseuchenkasse für die Bewilligung der für diese Studie erforderlichen Projektmittel sowie den Mitarbeitern und Tierärzten der an der Studie teilnehmenden Betriebe, den Mitarbeitern des TGD-Labors in Jena unter der Leitung von Frau Dr. Jost und Frau Dr. Einax sowie dem Diagnostik-Team des Institutes für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Besonderer Dank gebührt den Tierärzten des Thüringer Schweinegesundheitsdienstes, Frau Dr. Sabine Eger und Herrn Philipp Schwödiauer, für die Auswahl der für die Studie geeigneten Betriebe und die Unterstützung bei deren Akquise sowie den Mitarbeitern und Tierärzten der an der Studie teilnehmenden Betriebe für die Unterstützung bei der Probennahme.

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kaustricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtiger Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

La détection des fragments du génome du PRRSV et des anticorps spécifiques dans les cordes à mâcher permet le suivi des élevages porcins non suspects de PRRSV

Les échantillons de salive prélevés avec des cordes à mâcher ont fait leurs preuves dans la pratique pour diagnostiquer les infections à PRRSV. Le but de cette étude était de tester si des échantillons de salive prélevés avec des écouvillons salivaires (coton-tiges et GenoTube Livestock) ou avec des cordes à mâcher sont également adaptés au suivi des élevages non suspectés de PRRSV, c'est-à-dire de découvrir des animaux infectés avec une probabilité de 95% et une prévalence de 20%.

Dans cinq exploitations, des échantillons de salive collectifs ont été prélevés dans 12 à 16 boxes à l'aide de cordes à mâcher et des échantillons de salive individuels provenant d'un échantillon aléatoire de cinq animaux

Il rilevamento dei frammenti del genoma della PRRSV e degli anticorpi specifici con la tecnica della masticazione della corda consente il monitoraggio di allevamenti di suini non sospetti per la PRRSV

I campioni di saliva prelevati con la tecnica della masticazione della corda si sono dimostrati efficaci nella diagnosi delle infezioni da PRRSV. Lo scopo di questo studio era di verificare se tramite i tamponi salivari (tamponi di cotone e GenoTubeT) risp. i campioni di saliva prelevati con la tecnica della masticazione della corda sono adatti anche per il monitoraggio della PRRSV negli allevamenti non sospetti, ovvero di determinare una prevalenza del 20% di animali infetti con una probabilità del 95%.

In cinque allevamenti sono stati prelevati dei campioni collettivi di saliva prelevati con la tecnica della masticazione

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproductiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kastricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtiger Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

par boxe ont été examinés. Un total de 291 animaux de 58 lots dans quatre exploitations d'étude et 60 animaux de 12 lots dans une ferme témoin ont été échantillonnés. Les échantillons ont été prélevés dans toutes les catégories d'âge. L'examen de cinq échantillons de sérum individuels provenant des mêmes lots sur la base d'un système de surveillance existant a servi de méthode de référence pour la sensibilité relative des échantillons de salive. Les échantillons de mastication et de sérum ont été testés pour les anticorps par ELISA en utilisant deux systèmes différents pour les échantillons de sérum. Les échantillons provenant des cordes à mâcher, les écouvillonnages de salive GenoTube Livestock et les échantillons de sérum ont été examinés à la recherche de génomes viraux à l'aide d'une PCR à transcriptase inverse emboîtée et d'un kit commercial de PCR à transcriptase inverse en *temps réel*. Le Kappa de Cohen a été utilisé comme mesure de concordance.

À l'aide des cordes à mâcher, des anticorps PRRSV ont été détectés dans 44 enclos et à l'aide de sérum sanguin uniquement dans 34 enclos. L'ARN viral a été trouvé dans 13 (cordes à mâcher) et 16 (sérum) lots. Les écouvillons de salive GenoTube Livestock ont montré une sensibilité relative inférieure de 20,00% par rapport aux échantillons de sérum. La concordance des résultats de l'examen du sérum à l'aide de deux systèmes était très bonne pour les ELISA ($\kappa=0,911$), pour les systèmes PCR modérée ($\kappa=0,706$).

La comparaison des échantillons issus de cordes à mâcher avec des échantillons de sérum montre qu'ils sont adaptés à une surveillance supplémentaire des élevages non suspectés d'être atteints du SDRPV. En raison de leur manipulation plus simple et de leurs coûts d'examen réduits, ils peuvent être utilisés pour augmenter la fréquence des examens et ainsi améliorer le système de surveillance, mais ils ne constituent pas une alternative aux échantillons de sérum.

Mots clés: Coefficient Kappa de Cohen, ELISA, RT-PCR en *temps réel*, porcs, sensibilité, échantillons de salive

zione della corda da ciascuno dei 12–16 recinti e campioni individuali di saliva da un campione casuale di cinque animali per recinto. Sono stati campionati un totale di 291 animali da 58 recinti in quattro allevamenti nello studio e 60 animali da 12 recinti in un allevamento di controllo. I campioni sono stati prelevati per tutte le categorie di età. Come metodo di riferimento per la sensibilità relativa dei campioni di saliva ci si è avvalsi dell'analisi di cinque campioni di siero individuali provenienti dagli stessi recinti sulla base di un sistema di monitoraggio già esistente. I campioni prelevati con la tecnica della masticazione della corda e quelli sierologici sono stati analizzati per gli anticorpi via ELISA utilizzando due diversi sistemi per i campioni di siero. Sono stati analizzati per il genoma virale i campioni prelevati con la tecnica della masticazione della corda, i tamponi salivari con GenoTubeT e i campioni di siero con una PCR annidata con trascrizione inversa e con un kit PCR della trascrizione inversa in *tempo reale* commerciale. Il Kappa di Cohen è stato usato come misura di concordanza.

Grazie alla tecnica della masticazione della corda, gli anticorpi PRRSV sono stati rilevati in 44 recinti e con l'aiuto del siero del sangue in soli 34 recinti. L'RNA virale è stato trovato in 13 (con la tecnica della masticazione della corda) risp. 16 recinti (con siero). I tamponi salivari GenoTubeT hanno mostrato una sensibilità relativa inferiore al 20,00% rispetto ai campioni di siero. La concordanza dei risultati dell'analisi del siero via i due sistemi è stata molto buona per ELISA ($\kappa=0,911$) e moderata per i sistemi PCR ($\kappa=0,706$).

Il confronto dei campioni prelevati con la tecnica della masticazione della corda e con quelli di siero suggerisce che esse sono adatte per il monitoraggio supplementare delle aziende non sospette di PRRSV. Grazie alla loro facilità di manipolazione e ai costi inferiori dei test, queste tecniche possono essere utilizzate per aumentare la frequenza degli esami e quindi migliorare il sistema di monitoraggio, ma non sono un'alternativa ai campioni di siero. Il campionamento con tamponi salivari non è adatto.

Parole chiave: coefficiente Kappa di Cohen, ELISA, RT-PCR in *tempo reale*, suini, sensibilità, campioni di saliva

Literaturnachweis

- ¹ Arbeitsgemeinschaft der Schweinegesundheitsdienste. Verfahrensweise zur Feststellung und Überwachung der PRRS-Unverträglichkeit von Schweine haltenden Betrieben durch den Schweinegesundheitsdienst. 05.04 Aufl. Neubrandenburg, D <https://www.schweinegesundheitsdienste.de/services/files/sgd/2016-09-22%20AAW%20201%20Version%205%2004%20Endfassung.pdf>. Accessed 28.11.2019.
- ² Biernacka K, Karbowiak P, Wróbel P, Chareza, T, Czapowicz M, Balka, G, Goodell, C, Rauh, R, Stadejek, T. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and influenza A virus (IAV) in oral fluid of pigs. *Res. Vet. Sci.* 2016, 109: 74–80. doi:10.1016/j.rvsc.2016.09.014.
- ³ Carlsson U, Wallgren P, Renström LHM, Lindberg A, Eriksson H, Thorén P, Eliasson-Selling L, Lundeheim N, Nörregård E, Thörn C, Elvander M. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Sweden: detection, response and eradication. *Transbound. Emerg. Dis.* 2009, 56(4): 121–131. doi:10.1111/j.1865-1682.2008.01065.x.
- ⁴ Corbellini LG, Schwermer H, Presi P, Thür B, Stärk KD, Reist M. Analysis of national serological surveys for the documentation of freedom from porcine reproductive and respiratory syndrome in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 2006; 118 (3–4): 267–273. doi:10.1016/j.vetmic.2006.07.018.
- ⁵ Decorte I, van Breedam W, van der Stede Y, Nauwynck HJ, De Regge N, Cay AB. Detection of total and PRRSV-specific antibodies in oral fluids collected with different rope types from PRRSV-vaccinated and experimentally infected pigs. *BMC Vet. Res.* 2014; 10 (134). doi:10.1186/1746-6148-10-134.
- ⁶ Decorte I, van Campe W, Mostin L, Cay AB, De Regge N. Diagnosis of the Lelystad strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in individually housed pigs: comparison between serum and oral fluid samples for viral nucleic acid and antibody detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2015; 27: 47–54. doi:10.1177/1040638714561252.
- ⁷ Decorte I, van der Stede Y, Nauwynck H, De Regge N, Cay AB. Effect of saliva stabilisers on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid by quantitative reverse transcriptase real-time PCR. *Vet. J.* 2013; 197 (2): 224–228. doi:10.1016/j.tvjl.2013.02.001.
- ⁸ Dortmans JCFM, Buter GJ, Dijkman R, Houben M, Duinhof TF. Molecular characterization of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolated in the Netherlands from 2014 to 2016. *PLoS ONE*: e0218481. doi:10.1371/journal.pone.0218481.
- ⁹ Fablet C, Renson P, Pol F, Dorenlor V, Mahé S, Eono F, Eveno E, Le Dimna M, Liegard-Vanhecke D, Eudier S, Rose N, Bourry O. 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.* 2017; 204: 25–34. doi:10.1016/j.vetmic.2017.04.001.
- ¹⁰ Graage R, Hennig-Pauka I, Arbinger H, Ritzmann M, Ladinig A. Influence of age, group size and the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the collection of oral fluids. *Vet. J.* 2019; 244: 13–15. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.12.005.
- ¹¹ Gerber PF, O'Neill K, Owolodun O, Wang C, Harmon K, Zhang J, Halbur PG, Zhou L, Meng XJ, Opriessnig T. Comparison of commercial real-time reverse transcription-PCR assays for reliable, early, and rapid detection of heterologous strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected or noninfected boars by use of different sample types. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51 (2): 547–556. doi:10.1128/JCM.02685-12.
- ¹² Graage R: Nachweis des porzinen reproduktiven und respiratorischen Syndrom Virus in Serum- und in Speichelproben. Dissertation: München: Ludwig-Maximilians-Universität München, 2014.
- ¹³ Grouven U, Bender R, Ziegler A, Lange S. Der Kappa-Koeffizient. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2007; 132 Suppl 1: e65-8. doi:10.1055/s-2007-959046.
- ¹⁴ Kittawornrat A, Panyasing Y, Goodell C, Wang C, Gauger P, Harmon K, Rauh R, Desfresne L, Levis I, Zimmerman J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) surveillance using pre-weaning oral fluid samples detects circulation of wild-type PRRSV. *Vet. Microbiol.* 2014; 168 (2–4): 331–339. doi:10.1016/j.vetmic.2013.11.035.
- ¹⁵ Kittawornrat A, Wang C, Anderson G, Ballagi A, Broes A, Carman S, Doolittle K, Galeota J, Johnson J, Lizano S, Nelson E, Patnayak D, Pogranichniy R, Rice A, Scherba G, Zimmerman J. Ring test evaluation of the repeatability and reproducibility of a Porcine reproductive and respiratory syndrome virus oral fluid antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2012; 24 (6): 1057–1063. doi:10.1177/1040638712457929.
- ¹⁶ Mardassi H, Wilson L, Mounir S, Dea S.. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32 (9): 2197–2203.
- ¹⁷ Mur L, Gallardo C, Soler A, Zimmermann J, Pelayo V, Nieto R, Sánchez-Vizcaíno JM, Arias M. Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. *Vet. Microbiol.* 2013; 165 (1–2): 135–139. doi:10.1016/j.vetmic.2012.12.034.
- ¹⁸ Neira V, Brito B, Mena J, Culhane M, Apel MI, Max V, Perez P, Moreno V, Mathieu C, Johow M, Badía C, Torremorell M, Medina R, Ortega R. Epidemiological investigations of the introduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chile, 2013–2015. *PLoS ONE* 2017; 12 (7). doi:10.1371/journal.pone.0181569.
- ¹⁹ Olsen C, Wang C, Christopher-Hennings J, Doolittle K, Harmon KM, Abate S, Kittawornrat A, Lizano S, Main R, Nelson EA, Otterson T, Panyasing Y, Rademacher C, Rauh R, Shah R, Zimmerman J. 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.* 2013; 25 (3): 328–335. doi:10.1177/1040638713481471.
- ²⁰ Pesch S: Etablierung einer Nachweismethode für die zwei Genotypen von dem Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) und ein Beitrag zu seiner molekularen Epidemiologie. Dissertation: Universität Leipzig, 2003.
- ²¹ Prickett JR, Cutler S, Kinyon JM, Naberhaus N, Stensland WR, Yoon K-J, Zimmerman JJ. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *J. Swine Health Prod.* 2010; 18 (4): 187–195.
- ²² Prickett J, Kim W, Simer R, Yoon K-J, Zimmerman JJ. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J. Swine Health Prod.* 2008; 16 (2): 86–91.
- ²³ Prickett J, Simer R, Christopher-Hennings J, Yoon KJ, Evans RB, Zimmerman JJ. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kastricken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtigter Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

Der Nachweis von Genomfragmenten des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) und -spezifischen Antikörpern in Kaustrieken ermöglicht die Überwachung PRRSV-unverdächtiger Schweinehaltender Betriebe

K. David et al.

- oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J. Vet. Diagn. Invest* 2008; 20 (2): 156–163. doi:10.1177/104063870802000203.
- ²⁴ Prickett J, Zimmerman J. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res Rev* 2010; 11 (2): 207–216. doi:10.1017/S1466252310000010.
- ²⁵ Rathkjen PH, Dall J. Control and eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 using a modified-live type 2 vaccine in combination with a load, close, homogenise model: an area elimination study. *Acta Vet. Scand.* 2017; 59 (4): 1–12. doi:10.1186/s13028-016-0270-z.
- ²⁶ Regge N de, Cay B. 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* 2016; 11 (11). doi:10.1371/journal.pone.0166300.
- ²⁷ Rotolo ML, Sun Y, Wang C, Giménez-Lirola L, Baum DH, Gauger PC, Harmon KM, Hoogland M, Main R, Zimmerman JJ. Sampling guidelines for oral fluid-based surveys of group-housed animals. *Vet. Microbiol.* 2017; 209: 20–29. doi:10.1016/j.vetmic.2017.02.004.
- ²⁸ Rovira A, Reicks D, Muñoz-Zanzi C. Evaluation of surveillance protocols for detecting porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boar studs by simulation modeling. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007; 19 (5): 492–501. doi:10.1177/104063870701900506
- ²⁹ Sattler T, Wodak E, Schmolli F. 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.* 2015; 11 (70).
- ³⁰ Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch. Oral Biol.* 2007; 52 (12): 1114–1135. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.06.009.
- ³¹ Strutzberg-Minder K, Boehmer J, Fischer S, Homuth M, Gomez-Duran O, Finger G, Genzow M. Monitoring influenza A virus infection in pigs by using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect virus antibodies in pen-based oral-fluid specimens. *J. Swine Health Prod.* 2015; 23 (3): 126–131.
- ³² Thüringer Ministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit, Frauen und Familie (TMSGFF). Programm zur Förderung der Tiergesundheit in Schweinebeständen in Thüringen, ThürStAnz. 2008; 16: 566–567.
- ³³ Thüringer Ministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit, Frauen und Familie (TMSGFF). Schutz der Schweinebestände vor Infektionen mit Viren des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndroms (PRRS), ThürStAnz. 2011;6:186.
- ³⁴ Weiser AC, Poonsuk K, Bade SA, Gauger PC, Rotolo M, Harmon K, Gonzalez WM, Wang C, Main R, Zimmerman JJ. Effects of sample handling on the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluids by reverse-transcription real-time PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2018;30 (6): 807–812. doi: 10.1177/1040638718805534.

Korrespondenzadresse

PD Dr. med. vet. habil. Karsten Donat
 Thüringer Tierseuchenkasse
 Victor-Goerttler-Strasse 4,
 DE-07745 Jena
 Telefon: +49 3641 8855 0
 Fax: +49 3641 8855 55
 E-Mail: kdonat@thtsk.de