

Vergleich von Speichelproben und gepoolten Serumproben für den Nachweis von Antikörpern gegen das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus in Aufzuchtbeständen

R. Graage¹, S. Beck², M. Koch², M. Dolezal³, L. Schwarz², I. Hennig-Pauka²

¹Abteilung für Schweinemedizin, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 260, 8057 Zürich; ²Universitätsklinik für Schweine und ³Plattform Bioinformatik und Biostatistik, Veterinärmedizinische Universität Wien, 1220 Wien

Zusammenfassung

Für die Überwachung des Status von Porzinen Reproductiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) in Schweinebeständen hat sich der Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper aus Serumproben bewährt. Eine neuere Methode ist der Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper in Speichelproben. In dieser Studie wurden in neun PRRSV-verdächtigen Betrieben Serum- und Speichelproben entnommen und auf das Vorhandensein von PRRSV-spezifischen Antikörpern untersucht. Es wurden von 8 (± 1 Wochen) alten Schweinen insgesamt 220 Serum- und 41 Speichelproben entnommen. Pro Bucht wurden jeweils eine Speichelprobe und eine gepoolte Serumprobe (1:5) untersucht. Insgesamt waren 11 (Cut-off 0.4/0.3) bzw. 14 (Cut-off 0.2) Serumproben und 23 Speichelproben von 41 Buchten PRRSV-Antikörper positiv. Cohen's Kappa zwischen Speichel- und Serumproben zeigte eine mittlere Übereinstimmung ($\kappa = 0.446$). Die Speichelproben waren im Vergleich zu gepoolten Serumproben sehr sensitiv, die Spezifität betrug jedoch nur 60 bzw. 67%.

Schlüsselwörter: Diagnostik, ELISA, Monitoring, PRRSV, Schwein

Comparison between oral fluid samples and pooled serum samples for the detection of antibodies against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in weaning pig herds

Monitoring of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in pig farms is performed usually by testing for antibodies against PRRSV in serum samples. A new method is the detection of PRRSV antibodies in porcine saliva. In this study serum samples and saliva were collected in nine farms suspicious for PRRSV and tested for the presence of PRRSV antibodies. In total 220 serum and 41 saliva samples were taken from pigs at the age of 8 weeks (± 1 week). One saliva and one pooled serum sample (1:5) were tested from each pen. In total 11 (Cut-off 0.4/0.3) or 14 (Cut-off 0.2) serum samples and 23 saliva out of 41 pens were positive for PRRSV antibodies. Cohen's Kappa testing showed a moderate agreement ($\kappa = 0.446$). Saliva samples compared to pooled serum samples were very sensitive, the specificity was 60 and 67, respectively.

Key words: Diagnostic, ELISA, monitoring, pig, PRRSV

<https://doi.org/10.17236/sat00270>

Eingereicht: 01.05.2018
Angenommen: 14.06.2020

Vergleich von Speichelproben und gepoolten Serumproben für den Nachweis von Antikörpern gegen das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus in Aufzuchtbeständen

R. Graage et al.

Einleitung

Das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV) ist in den meisten schweineproduzierenden Ländern endemisch und zählt zu den wirtschaftlich bedeutendsten Erregern weltweit. Ergebnissen einer Untersuchung aus Nordamerika zufolge verursacht PRRSV jährlich Kosten von 668.59 Millionen Dollar in der US-amerikanischen Hausschweinpopulation.¹⁷ Ein effizienter und sicherer PRRSV-Nachweis ist daher notwendig, um einerseits Informationen über den PRRSV-Status der einzelnen Betriebe zu erlangen, und andererseits einen Überblick über die regionale oder nationale PRRSV-Situation zu erhalten.^{4,5} Als Nachweismethoden haben sich unter anderem die Polymerase Kettenreaktion (PCR) für den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und der Nachweis von PRRSV-spezifischen Antikörpern mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bewährt.^{1,6,27,28} PRRSV-spezifische Antikörper sind in einem Zeitraum von neun Tagen bis zu 12 Monaten nach einer Infektion nachweisbar und haben sich aufgrund der längeren Nachweisbarkeit im Vergleich zum Genomnachweis für Routinediagnostik bewährt.¹⁴

Seitens der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) werden Vorschläge zur Überwachung des PRRSV-Status erwähnt, die eine serologische Untersuchung sowie den Virusnachweis vorschlagen. Jedoch werden keine Aussagen bezüglich eines geeigneten Stichprobenschlüssels getroffen.³ Die mit dem Monitoring verbundenen hohen Laborkosten verhindern oft, dass einer ausreichenden Stichprobengröße Rechnung getragen wird. Um die Laborkosten zu minimieren, besteht die Möglichkeit, Serumproben zu poolen. Beim Poolen der Serumproben wird jedoch die Sensitivität herabgesetzt und es besteht die Gefahr, dass PRRSV-positive Betriebe falsch negativ bewertet werden.^{23,28} Eine aktuell diskutierte, zeiteffektive und nicht-invasive Alternative zur Blutprobenentnahme stellt die Entnahme des Speichels zum Nachweis von PRRSV-RNA und Antikörpern dar.^{10,18,26} Ein Vorteil der Speichelproben besteht darin, dass üblicherweise ein hoher prozentualer Anteil der Schweine in einer Bucht (bis zu 97%) am Kauseil gekaut haben.^{16,32} Dadurch kann die Anzahl der zu entnehmenden Proben gesenkt werden.¹³ Ein Nachteil bei der Speichelproben-diagnostik ist, dass routinemässig genutzte Laboruntersuchungen an das Medium Speichel adaptiert werden müssen.^{9,18,19}

Ziel der vorliegenden Studie war ein Methodenvergleich im Nachweis von Antikörpern gegen das PRRSV. Es wurden zwei ELISA's parallel in Speichelproben und gepoolten Serumproben miteinander verglichen. Von Bedeutung war, ob beide Methoden in ihrer Nachweisrate übereinstimmten. Aus diesem Grund wurden in

PRRSV-verdächtigen Beständen buchtenweise Speichelproben und dazugehörige einzelne Blutproben entnommen.

Die Blutproben aus der jeweiligen Bucht wurden gepoolt (5:1). Mit Hilfe der Ergebnisse sollte abgeschätzt werden, ob die nicht-invasiv gewonnenen Speichelproben eine Alternative zu invasiv genommenen und nachträglich gepoolten Serumproben bei Aufzuchtsschweinen sein können.

Material und Methode

In der vorliegenden Studie wurde der Nachweis von PRRSV-spezifischen Antikörpern in gepoolten Serumproben und in buchtenweise entnommenen Sammelspeichelproben untersucht. Hierfür wurden in 10 PRRSV-verdächtigen Betrieben bei acht Wochen alten Ferkeln (± 1 Woche) Kauseile für die Entnahme der Sammelspeichelproben aufgehängt. Im Anschluss wurden von fünf zufällig ausgewählten Schweinen derselben Bucht Blutproben entnommen und gepoolt (1:5). Die Blutprobenentnahmen erfolgten im Rahmen von den quartalsmässig tiergesundheitsdienstlich angeordneten und routinemässig durchgeführten Bestandesuntersuchungen zur Überwachung des PRRSV-Status. Die Serum- und Speichelproben wurden mit einem kommerziellen ELISA (IDEXX Laboratories GmbH, Mörikestasse 28/3, 71636 Ludwigsburg, Deutschland) auf das Vorhandensein PRRSV-spezifischer Antikörper untersucht. Die Übereinstimmung der Resultate beider Probenarten wurde statistisch überprüft.

Die Ethik- und Tierschutzkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien diskutierte und bewilligte die vorliegende Studie unter Berücksichtigung der guten wissenschaftlichen Praxis (Gutachten 18/07/97/2014).

Auswahl der Studienbetriebe und Stichprobengröße

In dieser Studie wurden 10 PRRSV-verdächtige schweinehaltende Betriebe für die Entnahme von Serum- und Speichelproben im Rahmen der PRRSV-Routineüberwachung des Tiergesundheitsdienstes Oberösterreich ausgewählt. Auswahlkriterium für die im Versuch verwendeten Betriebe war ein verdächtiger PRRSV-Status. Als PRRSV-verdächtig wurden solche Betriebe angesehen, in denen in vorangegangenen Untersuchungen PRRSV-RNA und/oder Antikörper nachgewiesen wurden, bzw. die Schweine mit einem attenuierten PRRSV-1-Lebendimpfstoff geimpft wurden. Im Betrieb neun lagen keine vorherigen Testresultate vor, jedoch zeigten die Tiere PRRSV-verdächtige klinische Symptome, wie vermehrtes Husten und Konjunktivitiden. Die ausgewählte Population sollte 8 Wochen (± 1 Woche) alt

sein und die Buchtengröße betrug 20-25 Tiere/Bucht (Tabelle 1). Die Stichprobengröße wurde anhand einer geschätzten Prävalenz von 50% berechnet, da angenommen wurde, dass es sich um endemisch infizierte Bestände mit einem hohen Anteil an Seroreagenten handelt.¹⁴ Aufgrund der angenommenen Prävalenz und der Buchtengröße wurde von 5 Schweinen je Bucht Blut entnommen (220 Schweine), sowie je eine SammelSpeichelprobe der Schweine aus allen Buchten (41 Buchten) gewonnen. Die Stichprobengröße wurde unter Einbeziehung der Sensitivität und Spezifität des verwendeten ELISA für die Cut-off-Werte 0,2, 0,3, 0,4 berechnet (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=FreeCalc2&Option>).²⁸ Der Stichprobenumfang war damit rechnerisch ausreichend, um mit mindestens 95%iger Sicherheit mindestens ein seropositives Tier in der Population zu erfassen.^{8,13}

Speichelprobenentnahme

Aus allen Buchten wurden Speichelproben entnommen (N=41). Die Speichelproben wurden mittels einem Kauseil aus unbehandelter Baumwolle (Sankt Josefs

Werkstatt, Algasing 1, 84405 Dorfen, Deutschland) entnommen. Das Kauseil wurde den Schweinen auf Schulterhöhe für 30 Minuten präsentiert.^{16,26} Nach 30 Minuten wurde das untere Ende des Kauseils in einen Plastikbeutel (Ziploc-Beutel) verbracht und im Beutel ausgewrungen. Die Speichelproben wurden zu je 5 ml aliquotiert und bei 900 × g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bis zur weiterführenden Analyse bei -80 °C gelagert.

Serumprobenentnahme

Für die tiergesundheitsdienstlich angeordnete PRRSV Überwachung wurde aus jeder Bucht von fünf zufällig ausgewählten Schweinen eine Blutprobe entnommen (N=220). Die Blutentnahme erfolgte in Abhängigkeit von Größe und Gewicht der Schweine entweder aus der *Vena cava cranialis* oder aus der *Vena jugularis externa* mittels einer Serum-Monovette (KABE Labortechnik GmbH, Jägerhofstrasse 17, 51588 Nümbrecht, Deutschland). Das Serum wurde durch Zentrifugieren der Blutprobe bei 1000 × g für 10 Minuten gewonnen. Aus fünf

Vergleich von Speichelproben und gepoolten Serumproben für den Nachweis von Antikörpern gegen das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus in Aufzuchtbeständen

R. Graage et al.

Tabelle 1: Übersicht über die Porzinen Reproductiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) verdächtigen Studienbetriebe. Angegeben ist, ob am Betrieb geimpft wird oder nicht und die Anzahl der gehaltenen Schweine/Jahr. Die Anzahl der belegten Buchten in der Aufzucht (ca. 25 Tiere/Bucht). Der angegebene PRRSV-Status wurde anhand vergangener serologischer und teilweise molekularbiologischer Untersuchungen vergeben.

Betrieb	Untersuchte Buchten (N)	PRRSV Status	Impfstatus	Letzte PRRSV Untersuchung	Anzahl der Sauen (S), Läufer (L), Mastschweine (M)/ Jahr	Blutproben (N)	Speichelproben (N)
B1	3	Verdächtig	ungeimpft	ELISA positiv (<1 Jahr)	S: 55 L: 900 M: 35	15	3
B2	3	Verdächtig	ungeimpft	ELISA positiv (<1 Jahr)	S: 32 L: 572 M: 155	15	3
B3	2	Verdächtig	geimpft (Sauen + Ferkel)	ELISA und PCR positiv (<1 Jahr)	S: 29 L: 528 M: 100	10	2
B4	3	Verdächtig	ungeimpft	ELISA positiv (<1 Jahr)	S: 55 L: 75 M: 15	15	3
B5	12	Verdächtig	ungeimpft	ELISA positiv (<1 Jahr)	S: 500 L: 500 M: 1500	60	12
B6	10	Verdächtig	geimpft (Sauen)	ELISA positiv (8 Jahre)	S: 330 L: 4312 M: 150	50	10
B7	2	Verdächtig	ungeimpft	ELISA positiv (<1 Jahr)	S: 37 L: 25 M: 0	10	2
B8	4	Verdächtig	geimpft (Sauen + Ferkel)	ELISA und PCR positiv (<1 Jahr)	S: 80 L: 100 M: 150	20	4
B9	2	Verdächtig	ungeimpft	ELISA und PCR positiv (1 Jahr)	S: 210 L: 50 M: 150	10	2
B10	3	unbekannt	ungeimpft	ELISA positiv (3 Jahre)	S: 31 L: 504 M: 250	15	0

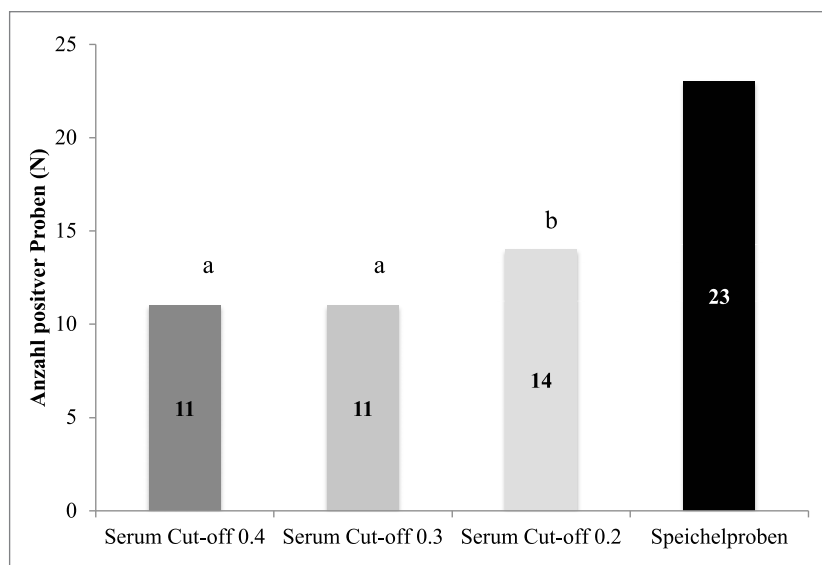


Abbildung 1: Vergleich der positiven Serum- und Speichelproben. Serum- und Speichelproben hatten eine mittlere signifikante Übereinstimmung im Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper (a: $\kappa = 0.446$; b: $\kappa = 0.577$). In 41 Buchten konnten in 23 (56%) Buchten im Speichel und in 11 (27%; Cut-off 0.4/0.3) bzw. 14 (36%; Cut-off 0.2) Buchten in den gepoolten Serumproben PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Einzelproben (200 μ l/Probe) wurde eine Poolprobe (1 ml) hergestellt und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper in Speichel- und Serumproben

Die Serumproben wurden mittels HerdCheck®PRRS X3 ELISA (IDEXX Laboratories GmbH, Mörikestrasse 28/3, 71636 Ludwigsburg, Deutschland) untersucht. Laut Hersteller besitzt das Testverfahren auf Herdenbasis eine Sensitivität von 98.9% und eine Spezifität von 99.9%. Die Proben wurden nach Gebrauchsanleitung analysiert. Die Analyseergebnisse wurden wie vom Testhersteller vorgesehen im Verhältnis zur Positivkontrolle (P/PK-Verhältnis) ermittelt. P/PK-Verhältnisse ≥ 0.4 , respektive ≥ 0.3 oder ≥ 0.2 der gepoolten Proben wurden als positiv bewertet.²⁸ Die Speichelproben wurden mittels HerdCheck®PRRS oral fluid X3 ELISA (IDEXX Laboratories GmbH, Mörikestrasse 28/3, 71636 Ludwigsburg, Deutschland) untersucht. Das Testverfahren besitzt eine Sensitivität von 94.7% und eine Spezifität

von 100%.¹⁹ Die Proben wurden nach Gebrauchsanleitung analysiert. P/PK-Verhältnisse ≥ 0.4 wurden als positiv bewertet.

Statistische Auswertung

Die Befunde wurden mit dem Statistikprogramm R Version 3.2.3 (R Core Team, 2015) statistisch ausgewertet. Die statistische Einheit war die Gruppe (Bucht) und das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0.05$ festgelegt. Als deskriptives Mass für eine Übereinstimmung der Analysemethoden wurde Cohen's Kappa (κ) mit dem R-Paket IRR (<https://CRAN.R-project.org/package=irr>) berechnet und folgendermassen interpretiert: 0.0: schlechte Übereinstimmung der Ergebnisse, 0.01-0.2: geringfügige Übereinstimmung der Ergebnisse, 0.21-0.40: ausreichende Übereinstimmung der Ergebnisse, 0.41-0.60: mittlere Übereinstimmung der Ergebnisse, 0.61-0.80: wesentliche Übereinstimmung der Ergebnisse, 0.81-0.99: annähernd vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse.³⁶

Zur Hypothesentestung wurde ein gemischtes lineares Modell mit den R-Paketen (lmer und lmerTest) gerechnet, mit gepoolten Serummessungen als abhängiger Variable und gepoolten Speichelmessung als unabhängiger Variable. Der Betrieb wurde als zufälliger Effekt ins Modell aufgenommen um der Kovarianzstruktur in den Daten (mehrere Buchten pro Betrieb) Rechnung zu tragen. Keine der Buchten wies einen auf speichelbasierten negativen, jedoch auf serumbasierten Proben positiven Test auf. Daher konnte keine logistische Regression zur Anwendung kommen.^{7,21}

Ergebnisse

In einem Betrieb (B10) konnten keine Speichelproben gewonnen werden. Daher wurde der Betrieb für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Insgesamt wurden 220 Blutproben und 41 Speichelproben aus neun Betrieben gewonnen. Insgesamt waren 11 (Cut-off 0.4/0.3) bzw. 14 (Cut-off 0.2) Serumproben und 23 Speichelproben von 41 Buchten PRRSV-Antikörper positiv. Cohen's Kappa, als Mass für die Interrater-Reliabilität zwischen den beiden Analysemethoden, war moderat. ($\kappa = 0.446$;

Tabelle 2: Vergleich der Porzinen Reproductiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) Ergebnisse der beiden Probenarten in einer Kreuztabelle. Es wurden die Speichelproben mit den verschiedenen Serumpoolproben Cut-offs (P/PK 0.4/0.3, 0.2) verglichen. Als Goldstandard dienen die Serumpoolproben. Die Sensitivität (Sens) der Speichelproben ist vergleichbar mit den Serumpoolproben (Sens = 1, 95% Konfidenzintervall [CI]: 71.51% respektive 76.84 - 100%) und die Spezifität beträgt 0.6 (P/PK 0.4, 0.3; 95% CI: 40% - 77.34%) respektive 0.67 (95% CI: 46.04 - 83.48%; P/PK 0.2).

		Serumpoolproben (P/PK >0.4, >0.3)		Serumpoolproben (P/PK >0.2)	
		Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Speichelproben	Positiv	11	12	14	9
	Negativ	0	18	0	18

$\kappa = 0.577$; Abbildung 1). Die errechnete Sensitivität (Sens) der Speichelproben entspricht den Serum-poolproben dem Cut-off 0.4/0.3 und Cut-off 0.2 (Sens = 1; 95%-Konfidenzintervall [CI]: 71.51% respektive 76.84 - 100%) und die Spezifität beträgt 0.6 (95% CI: 40% - 77.34%; P/PK 0.4, 0.3) respektive 0.67 (95% CI: 46.04 - 83.48%) bei einem Cut-off von 0.2 (Tabelle 2). Das gemischte lineare Model ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen gepoolten Speichel- und gepoolten Serumproben unter Berücksichtigung gemeinsamer Betriebsumwelten für jene Betriebe, die mit mehr als einer Bucht in der Analyse vertreten waren. Die im gepoolten Serum gemessenen Werte steigen im Durchschnitt um 0.182 Einheiten (P/PK Werte) an, wenn die Speichelmessung um eine Einheit steigt ($p < 1.07^{-10}$).

Die Höhe der ELISA-Cut-offs von 0.4 beziehungsweise 0.2 hatte keinen Einfluss auf die Klassifizierung eines Betriebes. In fünf Betrieben konnten sowohl in Speichelproben als auch in gepoolten Serumproben Antikörper gegen das PRRSV nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten in zwei weiteren Betrieben in Speichelproben PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, in denen die Untersuchung im Serum negativ verlief. In zwei Betrieben konnten weder in den Speichel- noch in den Serumproben Antikörper nachgewiesen werden (Tabelle 3).

Diskussion

Die PRRSV-Überwachung in negativen Betrieben oder einer negativen Region soll dem möglichst zeitnahen Nachweis des Infektionserregers nach seinem Eintrag in den Bestand dienen, um frühzeitig Massnahmen gegen seine Weiterverbreitung treffen zu können.^{4,5} Aufgrund eines grossen erforderlichen Stichprobenumfangs werden sehr hohe Laborkosten und einen hohen zeitlichen Aufwand für Probenentnahme und -analyse generiert. Um mit 95%iger Sicherheit ein positives Tier bei einer Prävalenz von 10% zu entdecken, bedarf es in Betrieben mit über 100 Tieren bereits 25 Proben.⁸ Neue, weniger invasive Probenentnahmemethoden sind daher dringend erforderlich, um den Tier- und Arbeitsschutz in schweinehaltenden Betrieben und der Tierärzte zu verbessern.³³

Hohe Stichprobenzahlen ziehen vor allem zu Beginn des Monitorings hohe Laborkosten nach sich.²³ Um Kosten zu sparen, besteht die Möglichkeit gepoolte Serumproben zum Nachweis von PRRSV mittels PCR und ELISA einzusetzen.^{28,29} Die in dieser Studie verwendeten Testverfahren besitzen eine Sensitivität 98.9% und eine Spezifität von 99.9% für Serumproben. Ob für einen Antikörpernachweis das Poolen von Serumproben allerdings eine geeignete Methode ist, um die Effizienz

Tabelle 3: Übersicht der Laborresultate der untersuchten Speichel- und Serumproben auf das Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV). Angegeben sind die positiv getesteten Proben im Verhältnis zu den analysierten Proben. Kursiv gekennzeichnet sind die Betriebe, die weder in Speichel- noch in den Serumproben PRRSV-spezifischen Antikörper aufwiesen. Fett markiert sind die Betriebe, in denen nur in Speichelproben PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten.

Betrieb	positive Speichelproben	positive Serumproben
B1	3/3	2/3
B2	2/3	2/3
B3	2/2	½
B4	0/3	0/3
B5	10/12	4/12
B6	2/10	2/10
B7	2/12	0/2
B8	0/4	0/4
B9	1/2	0/2

bei der Überwachung von Krankheiten mit geringer Prävalenz zu steigern und Laborkosten zu senken, wird kontrovers diskutiert. Durch das Poolen von Serumproben oder durch die buchtenweise Gewinnung von Speichelproben wird die Probenanzahl gesenkt.^{2,20,22,23,28,27} Es sollte berücksichtigt werden, dass aufgrund der Spezifität der Testverfahren auch falsch positive Proben auftreten können, die dann weiterführende Untersuchungen nach sich ziehen, was zu weiteren Kosten führt. Aus den Ergebnissen einer Studie konnte geschlossen werden, dass PRRSV-Überwachungsprogramme grundsätzlich durch gepoolte Proben verbessert werden könnten.²⁸ Auch in der Humanmedizin werden solche pooling-Strategien verwendet. Bei dem Antikörpernachweis des Humanen T-lymphotropen Virus I/II können fünf Serumproben gepoolt werden, ohne dass es zu einem Verlust der Sensitivität kommt.² In der hier beschriebenen Studie wurde der Cut-off bewusst gesenkt und es bestand kein signifikanter Einfluss auf die Identifizierung PRRSV-positiver Betriebe. Die Interrater-Reliabilität beider Messmethoden war moderat jedoch signifikant. Je näher der Cohen's Kappa gegen 1 ist, umso mehr stimmt die Interrater-Reliabilität überein.^{15,36} McHugh (2012) empfiehlt daher ein Cohen's Kappa von 0.8 als akzeptables Minimum bei der Verwendung Interrater-Reliabilität-Analysen.¹⁵ Publierte Infektions- und Feldversuche schlussfolgerten jedoch, dass die Überwachung des PRRSV-Status mittels Sammelspeichelproben eine adäquate Alternative zu der Überwachung des PRRSV-Status mittels Serumproben ist.^{10,11,18,19,24,25,26,31,33} In den Studien wurden jedoch entweder individuell entnommene Proben (Speichel und Serum) oder buchtenweise entnommene Speichelproben mit individuell entnommenen Serumproben vergli-

Vergleich von Speichelproben und gepoolten Serumproben für den Nachweis von Antikörpern gegen das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus in Aufzuchtbeständen

R. Graage et al.

chen.^{18,25,26,31,33} Ein Grund für diesen moderaten Zusammenhang zwischen beiden Analysemethoden könnte die Aufnahme von PRRSV-Antikörpern über plasmahaltigem Futter, falsch positive Speichelproben, sein.³⁰ Auch das Entnahmematerial, sowie das Medium Speichel können einen Einfluss auf den Nachweis von Antikörpern in Speichelproben haben.^{10,24} In der Studie wurde ein Serum-ELISA, der für die Analyse von individuellen Serumproben entwickelt wurde, genutzt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Poolen der Serumproben durch den Verdünnungseffekt zu einer Minderung der Sensitivität der Poolproben und falsch negativ identifizierter Proben geführt hat. Nur eine Studie analysierte den Effekt der Poolgröße auf die Sensitivität und Spezifität des PRRSV-Antikörpernachweises. Hierfür wurde eine positive Probe mit 2 bis 10 negativen Proben verdünnt, ohne die geänderte Prävalenz der positiven Probe innerhalb des Pools zu beachten.²⁸ Auch in dieser Studie ist der Anteil an positiven Proben innerhalb des Pools nicht bekannt, da die in der Probe repräsentierten Tiere zufällig ausgewählt wurden. Dies gilt auch für die entnommenen Speichelproben. Der Anteil an PRRSV-Antikörper-positiven Tieren innerhalb der Probe nicht evaluiert wurde. De Regge und Cay (2016) bestätigten in ihrer Studie, dass auch wenn nur ein Schwein in einer Bucht positiv für PRRSV-Antikörper ist, die buchtenweise entnommene Sammelspeichelprobe auch positiv ausfällt und der Verdünnungsfaktor durch PRRSV-Antikörper-negative Schweine als gering einzuschätzen ist.¹⁰ Auch die Änderung des Cut-offs hatte keinen deutlichen Einfluss auf das Mass der Übereinstimmung der beiden Analysemethoden. Der hier verwendete Speichel-ELISA besitzt eine Sensitivität von 94.7% und eine Spezifität von 100%.¹⁹ Der ELISA zur Detektion von PRRSV-Antikörpern im Speichel ist als hoch spezifisch einzuschätzen. In dieser Studie konnten jedoch in fünf Betrieben in Speichel- und Serumproben und in zwei weiteren Betrieben konnten zwar in Speichel-, nicht aber in Serumproben PRRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, was im direkten Vergleich mit den gepoolten Serumproben eine Spezifität von 60 bzw. 67% ergibt. Dies bedeutet, dass ca. ein Drittel der Buchten mit einer negativen gepoolten Serumprobe eine positive Speichelprobe vorweist.

Studien ergaben auch, dass bis zu ca. 80% der Schweine einer Bucht an einem Baumwollstrick kauen und somit eine grössere Tierzahl in der Probe vertreten ist als durch Serumproben erreicht werden kann.^{16,32} Die Entnahme der Speichelproben ist jedoch eine einfache und stressfreie Probenentnahmemethode, da das natürliche Ver-

halten der Schweine ausgenutzt wird, neue Gegenstände aus Neugier zu benagen. In einem Betrieb konnten keine Speichelproben gewonnen werden, da die Schweine den Kaustrick ignoriert hatten. Eine Ursache könnte ein sehr hohes Angebot an Beschäftigungsmaterial gewesen sein.¹² Auch die Gruppengröße, Rangordnung und der Gesundheitszustand können die Benageintensität des Stricks beeinflussen.^{34,35} Die Expositionsdauer des Stricks von 30 Minuten ist ausreichend, um einen hohen Anteil der Schweine, die den Strick dann mit Speichel benetzt haben, zu erfassen. In Verhaltensstudien konnte nach 30 Minuten kein signifikanter Anstieg der Tier-Strick-Interaktion mehr beobachtet werden.^{16,32}

Eine längere Expositionsdauer führt daher zu keiner Steigerung der Anzahl an Schweinen die an dem Strick gekaut haben bzw. dass in Buchten ohne Tier-Strick-Interaktion das Interesse gesteigert wird.

Schlussfolgerung

Das buchtenweise Sammeln von Speichelproben ist eine geeignete Methode, um PRRSV-spezifische Antikörper in PRRSV-infizierten Beständen auf Betriebsebene nachzuweisen. Der Vorteil der Speichelproben besteht in einer einfachen und stressfreien Entnahme der Proben, aber auch darin, dass altersgruppenabhängig bis zu 97% der Schweine in einer Probe repräsentiert werden. Der Vergleich zwischen gepoolten Serumproben und buchtenweise entnommenen Speichelproben ist jedoch vorsichtig zu interpretieren, da der Effekt der Verdünnung innerhalb des Serumpools und der Speichelprobe auf die tatsächliche Sensitivität und Spezifität des PRRSV-Antikörpernachweises schwer einzuschätzen ist. Die vorliegende Studie zeigte, unter Verwendung eines gemischten linearen Modells, einen signifikanten Zusammenhang zwischen Speichel- und gepoolten Serumproben. Jedoch wiesen die beiden Analysemethoden nur ein moderates Mass an Übereinstimmung auf. Die Speichelproben waren im Vergleich zu gepoolten Serumproben sehr sensitiv, die Spezifität betrug jedoch nur 60 bzw. 67%.

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt den Bestandstierärzten und dem TGD für die Mithilfe bei der Auswahl der Studienbetriebe. Des Weiteren möchten die Autoren den Landwirten für ihre Kooperation danken.

Comparaison entre échantillons salivaires et pool de sérums dans la mise en évidence d'anticorps contre le syndrome reproducteur et respiratoire porcin dans des exploitations d'élevage

La surveillance du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV) dans les élevages de porcs est généralement effectuée en recherchant des anticorps contre le PRRSV dans des échantillons de sérum. Une nouvelle méthode est la détection des anticorps anti-PRRSV dans la salive porcine. Dans cette étude, des échantillons de sérum et de salive ont été prélevés dans neuf exploitations suspectes de PRRSV et testés quant à la présence d'anticorps PRRSV. Au total, 220 échantillons de sérum et 41 échantillons de salive ont été prélevés sur des porcs à l'âge de 8 semaines (± 1 semaine). De chaque boîte, un échantillon de salive et un échantillon de sérums regroupé (1: 5) ont été testés. Au total, 11 échantillons de sérum (seuil 0,4/0,3) ou 14 (seuil 0,2) et 23 de salive sur 41 boîtes étaient positifs quant aux anticorps anti-PRRSV. Le test Kappa de Cohen a montré une corrélation modérée ($\kappa = 0,446$). Les échantillons de salive étaient très sensibles par rapport aux échantillons de sérum regroupés, la spécificité n'était toutefois que de 60 respectivement 67.

Mots clés: Diagnostic, ELISA, surveillance, porc, PRRSV

Confronto tra campioni di saliva e campioni di siero in pool per la rilevazione di anticorpi contro il virus della Sindrome respiratoria e riproduttiva dei suini negli allevamenti

Per il monitoraggio dello stato del virus della sindrome respiratoria e riproduttiva dei suini (PRRS) negli allevamenti di suini, il rilevamento di anticorpi specifici per il virus PRRS da campioni di siero si è dimostrato efficace. Un metodo più recente è il rilevamento di anticorpi specifici del virus PRRS nei campioni di saliva. In questo studio, sono stati raccolti campioni di siero e saliva da nove aziende agricole con sospetto di virus PRRS e analizzati sulla presenza di anticorpi specifici del virus PRRS. In totale sono stati prelevati 220 campioni di siero e 41 campioni di saliva provenienti da suini di età di 8 settimane (± 1 settimana). Sono stati esaminati un campione di saliva e un campione di siero in pool (1:5) per recinto. In totale 11 (cut-off 0,4/0,3) e 14 (cut-off 0,2) campioni di siero e 23 campioni di saliva da 41 recinti sono risultati positivi agli anticorpi del virus PRRS. Il test Kappa di Cohen ha mostrato, tra i campioni di saliva e di siero, un accordo discreto ($\kappa = 0,446$). I campioni di saliva erano molto più sensibili rispetto ai campioni di siero in pool, ma la specificità era solo rispettivamente del 60 e del 67%.

Parole chiave: Diagnostica, ELISA, monitoraggio, virus PRRS, suino

Vergleich von Speichelproben und gepoolten Serumproben für den Nachweis von Antikörpern gegen das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus in Aufzuchtbeständen

R. Graage et al.

Literaturnachweis

- Albina E, Leforban Y, Baron T, Plana Duran JP, Vannier P: An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann Rech Vet.* 1992; 23(2): 167-176.
- Andersson S, Gessain A, Taylor GP: Pooling of samples for seroepidemiological surveillance of human T-cell lymphotropic virus types I and II. *Virus Res.* 2001; 78(1-2):101-106
- Anonym: Porcine reproductive and respiratory syndrome. In OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (web version). 2018: 1-15 (access 07.08.2018)
- Arruda A, Friendship R, Carpenter J, Hand K, Ojic D, Poljak Z: Investigation of the occurrence of porcine reproductive and respiratory virus in swine herds participating in an area regional control and elimination project in Ontario, Canada. *Transbound Emerg Dis.* 2017; 64(1): 89-100.
- Arruda AG., Poljak Z, Friendship R, Carpenter J, Hand K: Descriptive analysis and spatial epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) for swine sites participating in area regional control and elimination programs from 3 regions of Ontario. *Can J Vet Res.* 2015; 79(4): 268-278.
- Balka G, Hornyak A, Balint A, Benyeda Z, Rusvai M: Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol Methods.* 2009; 158(1-2): 41-45.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S: Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw.* 2015; 67(1), 1-8. doi:10.18637/jss.v067.i01 (accessed 26.12.2018)
- Cannon RM, Roe RT: Livestock disease surveys : A field manual for veterinarians. Australian Government Pub Service. 1982.
- Chittick WA, Stensland WR, Prickett JR, Strait EL, Harmon K, Yoon K, Wang C, Zimmerman JJ: Comparison of RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine oral fluid specimens. *J Vet Diag Invest.* 2011; 23(2), 248-253.
- De Regge N, 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; 1(11):e0166300, doi.org/10.1371/journal.pone.0166300 (accessed 13.03.2018)

Vergleich von Speichelproben und gepoolten Serumproben für den Nachweis von Antikörpern gegen das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus in Aufzuchtbeständen

R. Graage et al.

- ¹¹ 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 Diag Invest.* 2015; 27(1): 47-54.
- ¹² Docking CM, Van de Weerd HA, Day J, Edwards SA: The influence of age on the use of potential enrichment objects and synchronisation of behaviour of pigs. *Appl Anim Behav Sci.* 2008; 110(3-4): 244-257.
- ¹³ Dohoo I, Martin W, Styhn: Sampling. In Dohoo I, Martin W, Styhn (eds.), *Veterinary Epidemiologic Research* 2nd Edition. VER Inc., Chalfontetown, Kanada, 2014: 33-54
- ¹⁴ Duinhof T, van Schaik G, van Esch E, Wellenberg G: Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. *Vet Microbiol.* 2011; 150(1-2): 180-184.
- ¹⁵ McHugh ML: Interraterreliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb).* 2012; 22(3): 276-282
- ¹⁶ 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(1), 13-15
- ¹⁷ Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Zimmerman JJ, Neumann E, Rotto H, Yoder TK, Wang C, Yeske P, Mowrer CL, Haley, C.: Economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on US pork producers. *Animal Industry Report.* 2012, AS 658, ASL R2671.
- ¹⁸ Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, Patnayak D, Schwartz T, Whitney D, Olsen C: 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.* 2010; 154(1-2): 170-176.
- ¹⁹ Kittawornrat A, Prickett J, Wang C, Olsen C, Irwin C, Panyasing Y, Ballagi A, Rice A, Main R, Johnson J, Rademacher C, Hoogland M, Rowland R, Zimmerman J: Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diag Invest.* 2012; 24(2): 262-269.
- ²⁰ Kline RL, Brothers TA, Brookmeyer R, Zeger S, Quinn TC: Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence in population surveys using pooled sera. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(7): 1449-1452.
- ²¹ Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB: ImerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *J Stat Softw.* 2017; 82:1-26. doi:10.18637/jss.v082.i13 (access 26.12.2018)
- ²² Maherchandani S, Muñoz-Zanzi CA, Patnayak DP, Malik YS, Goyal SM: The effect of pooling sera on the detection of avian pneumovirus antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay test. *J Vet Diag Invest.* 2004; 16(6): 497-502.
- ²³ Muñoz-Zanzi C, Thurmond M, Hietala S, Johnson W: Factors affecting sensitivity and specificity of pooled-sample testing for diagnosis of low prevalence infections. *Prev Vet Med.* 2006; 74(4): 309-322.
- ²⁴ 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, Rau 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 Diag Invest.* 2013; 25(3): 328-335.
- ²⁵ Pepin B, Liu F, Main R, Ramirez A, Zimmerman J: Collection of oral fluid from individually housed sows. *J Swine Health Prod.* 2015; 23(1): 35-37.
- ²⁶ Prickett J, Simer R, Christopher-Hennings J, Yoon K, Evans RB, Zimmerman JJ: Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: A longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diag Invest.* 2008; 20(2): 156-163.
- ²⁷ Revilla-Fernández S, Wallner B, Truschner K, Benczak A, Brem G, Schmoll F, Mueller M, Steinborn R: The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. *J Virol Methods.* 2005; 126(1-2): 21-30.
- ²⁸ Rovira A, Balasch M, Segalés J, Garcia L, Plana-Duran J, Rosell C, Ellerbrok H, Mankertz A, Domingo M: Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol.* 2002; 76(7): 3232-3239.
- ²⁹ 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.
- ³⁰ Sattler T, Pikalo J, Verhovsek D, Wodak E, Schmoll F: Influence of spray-dried plasma in swine feed on PRRSV antibody diagnostic in oral fluid. *Proceedings, 7th European Symposium of Porcine Health Management, Nantes, Frankreich, 2015*
- ³¹ Sattler T, Wodak E, Schmoll 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; 1:70. doi.org/10.1186/s12917-015-0388-7 (accessed 13.03.2018).
- ³² Seddon Y, Guy J, Edwards S: Optimising oral fluid collection from groups of pigs: Effect of housing system and provision of ropes. *Vet J.* 2012; 193(1): 180-184.
- ³³ Steinrigl A, Revilla-Fernández S, Schmoll F, Sattler T: Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus Type 2 in blood and oral fluid collected with GenoTube swabs. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2016; doi.org/10.2376/0005-9366-16029 (accessed 13.03.2018).
- ³⁴ Turner S, Allcroft D, Edwards S: Housing pigs in large social groups: A review of implications for performance and other economic traits. *Livest Prod Sci.* 2003; 82(1): 39-51.
- ³⁵ Turner S, Sinclair A, Edwards S: The interaction of live-weight and the degree of competition on drinking behaviour in growing pigs at different group sizes. *Appl Anim Behav Sci.* 2000; 67(4): 321-334.
- ³⁶ Viera AJ, Garrett JM: Understanding interobserver agreement: The kappa statistic. *Fam Med.* 2005; 37(5): 360-363.

Korrespondenzadresse

Dr.med.vet. Robert Graage
Abteilung für Schweinemedizin
Departement für Nutztiere
Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich
Winterthurerstrasse 260
CH-8047 Zürich
Tel: +41 44 635 9076
E-Mail: rgraage@vetclinics.uzh.ch