

INDAGINE PRELIMINARE SULLA PRESENZA DI ANTICORPI ANTI VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) NEGLI EMOSIERI TESTICOLARI

PILOT INVESTIGATION ON THE PRESENCE OF ANTI - HEPATITIS E VIRUS ANTIBODIES IN PIGLET PROCESSING FLUIDS

DI BARTOLO I.¹, DE SABATO L.¹, CHELLI E.¹, ALBORALI G.L.², TONNI M.², MONINI M.¹, DE LUCIA A.³, OSTANELLO F.³

¹ *Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, 00161, Roma, Italy*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Via Bianchi, 9, 25124, Brescia, Italy*

³ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italy*

Parole chiave: virus dell'epatite E, sierologia, suini, sorveglianza, emosieri testicolari
Keywords: Hepatitis E virus, serology, swine, surveillance, processing fluids

RIASSUNTO

Il virus dell'epatite E (HEV) è un virus a RNA che causa, nell'uomo, un'epatite acuta generalmente autolimitante. I suini (domestici e selvatici) sono il principale reservoir. L'identificazione delle aziende infette è il presupposto principale per implementare dei programmi di sorveglianza per questa zoonosi, ormai considerata emergente, e per ridurre il rischio di introdurre prodotti contaminati nella filiera di produzione degli alimenti. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare il possibile uso degli emosieri testicolari ottenibili al momento della castrazione dei suinetti (*processing fluids*, PF) per la ricerca di anticorpi anti-HEV. Cinquantacinque campioni individuali appaiati di siero e PF sono stati prelevati da altrettanti suinetti appartenenti a 20 diverse nidi e analizzati con un kit commerciale ELISA per la ricerca di anticorpi anti-HEV. Una correlazione positiva ($\rho=0,677$; $p<0,01$) è stata evidenziata tra il rapporto signal-to-cut-off (S/Co) degli anticorpi anti-HEV nei campioni di siero e di PF. In tutte le nidi era presente almeno 1 suinetto sieropositivo ma solo 13 (65%) sono risultate positive anche nei PF. Per valutare il possibile utilizzo di pool di PF e il limite di rilevabilità del test ELISA, sono stati creati pool artificiali miscelando emosieri individuali positivi con valore ELISA S/Co alto, medio, medio-basso e basso con 3, 4, 5 e 6 campioni individuali negativi di PF. I risultati ottenuti suggeriscono che è ancora possibile identificare un pool positivo quando almeno un campione individuale di PF con medio (S/Co>2,5) o alto (S/Co>6) livello anticorpale è miscelato con 5 o 6 campioni individuali di PF negativi. Il rilevamento, nei PF, di anticorpi anti-HEV di origine materna indica una passata esposizione al virus delle scrofe. I PF potrebbero rappresentare uno strumento rapido, non-invasivo ed economico per identificare le aziende infette da HEV.

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is an RNA virus causing an acute generally self-limited disease in humans. Pigs and wild boars are the main reservoirs. Identifying HEV positive pig farms is important to implement surveillance programmes for this emerging zoonotic agent and

to limit the risk of introducing contaminated products into the food chain. The aim of this study was to evaluate the use of serosanguineous fluids obtained as part of castration practice (processing fluids, PF) to detect anti-HEV antibodies in newborn piglets. Fifty-five paired serum and PF samples were collected from piglets of 20 different litters and tested with a commercial ELISA kit. A positive correlation ($\rho=0.677$; $p<0.01$) was found between signal-to-cut-off (S/Co) ratio of anti-HEV antibodies in serum and PF samples. In all litters there was at least one positive piglet in serum. Thirteen litters (65%) were also positive in PF. To simulate the use of PF as pooled samples, the limit of detection of the ELISA was assessed mixing the PF sample with strong, medium, medium-weak and weak ELISA S/Co with 3, 4, 5 and 6 negative PF samples. Our results suggest that it is still possible to identify a positive PF pool when at least one individual PF with medium ($S/Co>2.5$) or strong ($S/Co>6$) antibody level is mixed with 5 or 6 individual negative PF samples. The detection of anti-HEV maternal-derived antibodies in PF confirms a past exposure of sows to the virus. PF may represent a rapid, non-invasive and economical tool to identify HEV positive farms.

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite E (HEV) è causa di epatite negli animali e nell'uomo (Purcell e Emerson, 2008). HEV è un RNA virus a singolo filamento dotato di quasi-envelope classificato nella famiglia *Hepeviridae*, genere *Orthohepevirus* (Purdy *et al.*, 2017). Le specie del genere *Orthohepevirus A* comprendono 8 genotipi (da HEV-1 a HEV-8) in grado di infettare l'uomo ed altri mammiferi. Solo i ceppi appartenenti ai genotipi da HEV-1 a HEV-4 sono stati messi in evidenza in Europa. HEV-1 e HEV-2 infettano solo l'uomo mentre HEV-3 e HEV-4 sono zoonosici. In passato, in Europa, i casi umani causati da HEV-1 e HEV-2 erano messi in relazione con soggiorni in aree endemiche (Paesi in via di sviluppo). Tuttavia, negli ultimi 10 anni, è stato descritto un numero crescente di casi autoctoni, causati dalla trasmissione zoonosica dei genotipi HEV-3 e HEV-4 (Aspinall *et al.*, 2017), attualmente considerati endemici in alcuni Paesi industrializzati (Chalupa *et al.*, 2014). In Europa, la trasmissione alimentare di HEV-3 e HEV-4 sembra essere una delle principali modalità di infezione ed è correlata al consumo di prodotti a breve stagionatura (principalmente salsicce contenenti fegato di suino) e carne poco cotta di cinghiale (Kamar *et al.*, 2017).

La presenza di HEV-3, il genotipo più frequente in Europa, è stata largamente descritta nelle popolazioni di suini (Pavio *et al.*, 2017). La trasmissione all'uomo può quindi essere favorita dall'elevata prevalenza di aziende e capi infetti.

In Europa, la sieroprevalenza intra-aziendale per HEV varia dal 30% al 98% (Salines *et al.*, 2017), con alcune differenze relative ai singoli Paesi (Casas *et al.*, 2009, Lange *et al.*, 2017, Rose *et al.*, 2011). Anche la prevalenza di animali infetti è molto variabile: da un minimo del 10% fino a un massimo del 100% (Salines *et al.*, 2017).

Negli ultimi anni, sono stati implementati numerosi metodi per la ricerca sia dell'RNA di HEV sia di anticorpi specifici (IgG e IgM) (Kumar *et al.*, 2013, Ponterio *et al.*, 2014, Purcell e Emerson, 2008).

A causa delle implicazioni di sanità pubblica e della sua grande diffusione nelle popolazioni di suini, è importante determinare la prevalenza di allevamenti infetti. Sono quindi necessari programmi di sorveglianza per HEV allo scopo di acquisire maggiori conoscenze sulla presenza, prevalenza e caratteristiche dei ceppi circolanti negli allevamenti, al fine di implementare eventuali misure di controllo con lo scopo di ridurre il rischio di infezione nei suini e, di conseguenza, il rischio di trasmissione di HEV all'uomo (EFSA, 2017, Salines *et al.*, 2017).

La castrazione chirurgica dei suini è una pratica routinaria e, verosimilmente, lo sarà ancora nel prossimo futuro, almeno fino a quando non saranno disponibili efficaci sistemi alternativi. Se la scrofa è entrata in contatto con HEV nel corso della sua vita, è lecito ritenere che, come per altri patogeni, i suinetti ricevano, attraverso il colostro, anticorpi di origine materna (MDA) specifici per HEV che potrebbero essere rilevati nei fluidi sieromorragici (emosieri) originati dai testicoli asportati (*processing fluids*, PF).

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'impegno dei PF come matrice biologica per rilevare MDA anti-HEV, allo scopo di identificare in maniera rapida ed economica gli allevamenti infetti.

MATERIALI E METODI

Campioni

Lo studio è stato condotto in un'azienda a ciclo chiuso del nord Italia con circa 2500 scrofe. L'azienda è positiva stabile nei confronti del virus della Sindrome riproduttiva e respiratoria (PRRSV) ed è dotata di elevate misure di biosicurezza. L'allevamento viene condotto in bande settimanali; di conseguenza, la castrazione dei suinetti viene effettuata con la stessa cadenza. Come stabilito dalla direttiva 2008/120/EC, le code non vengono tagliate. I PF esaminati sono stati quindi ricavati esclusivamente dai testicoli.

Il numero di nidiata da esaminare (20) è stato calcolato in modo da garantire il 95% di probabilità di evidenziare almeno una nidiata positiva quando la sieroprevalenza è $\geq 5\%$. Cinque delle 20 scrofe esaminate (tutte nate in azienda) erano primipare e 15 pluripare. Questa proporzione è rappresentativa della distribuzione per età delle scrofe aziendali.

Le nidiata, prima delle adozioni, sono state selezionate in maniera casuale durante le procedure di castrazione (effettuata a circa 3 giorni di vita). Da tre suinetti per ciascuna nidiata (selezionati in maniera casuale) sono stati raccolti un campione di sangue e i testicoli. I campioni di sangue sono stati prelevati utilizzando un ago sterile per ciascun suinetto. I testicoli sono stati raccolti individualmente e posti all'interno di un sacchetto di plastica. Dopo circa tre ore a temperatura ambiente, i testicoli sono stati rimossi e l'emosiero è stato prelevato asepticamente. Il siero è stato ottenuto dal sangue ed entrambi i campioni sono stati conservati a -20°C fino all'esecuzione delle analisi.

Ricerca degli anticorpi anti-HEV

Per la ricerca degli anticorpi anti-HEV nei campioni di siero e di PF è stato utilizzato un kit commerciale ELISA (HEV-Ab, Wantai Biopharmaceutical Inc., Beijing, China), seguendo le istruzioni del produttore. Il kit commerciale ELISA utilizzato in questo studio consente di mettere in evidenza gli anticorpi totali anti-HEV ed è validato per l'esame dei sieri e non dei PF. Come specificato dal produttore, il valore di cut-off è stato calcolato come media dei valori di densità ottica (OD) di tre sieri negativi di controllo $+0,12$. I sieri e i PF individuali con un valore di OD superiore al valore di cut-off sono stati considerati positivi per anticorpi anti-HEV. La nidiata è stata considerata positiva quando almeno uno dei suinetti esaminati è risultato positivo alla ricerca di anticorpi anti-HEV nel siero e/o nel PF. Il rapporto signal-to-cut-off (S/Co) è stato calcolato per ciascuno dei campioni esaminati secondo la seguente formula: valore di OD del campione/valore di cut-off.

Per simulare l'uso di pool di campioni di PF, il limite di rilevabilità del test ELISA è stato valutato miscelando 10 μl di PF, selezionati in maniera casuale, con alto, medio, medio-basso e basso valore S/Co (rispettivamente: 6,36; 2,53; 1,73 e 1,24) con un uguale volume di 3, 4, 5 e 6 campioni di PF negativi (S/Co $<0,03$) (diluizione da 1:4 a 1:7).

Analisi statistica

I risultati (a livello individuale e di nidiata) sono stati statisticamente analizzati considerando come *gold standard* i risultati del test ELISA eseguito sul siero. La proporzione di suinetti e nidiata positive al test ELISA (nel siero o nel PF) in funzione del numero di parti della scrofa è stata confrontata utilizzando il test di Fisher. Gli intervalli di confidenza sono stati calcolati con il metodo binomiale di Clopper-Pearson, basato su una distribuzione β .

Per valutare la possibile correlazione tra i valori di S/Co dei sieri e dei PF, è stato calcolato il coefficiente di correlazione non parametrico *rho* di Spearman. La curva ROC (*receiver operating characteristic*) è stata utilizzata per definire il cut-off ottimale per l'interpretazione dei valori di S/Co ottenuti esaminando i PF. Sono stati inoltre calcolati i valori di sensibilità (Se) e di specificità (Sp) relativi.

La concordanza tra i risultati ottenuti dall'esame del siero e dei PF individuali, è stata calcolata (per ciascun animale e per ciascuna nidiata) utilizzando il coefficiente Kappa (*K*) di Cohen (Altman, 1991). La concordanza è stata calcolata utilizzando sia il valore di cut-off suggerito dal produttore sia quello calcolato.

La sensibilità dell'esame dei pool artificiali di PF (pSe) è stata calcolata come rapporto tra il numero di nidiata positive all'esame dei PF e quello delle nidiata positive nel siero.

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il software SPSS, version 25 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA).

RISULTATI

Campioni di siero e di PF sono stati prelevati da tre suinetti, selezionati casualmente, da ciascuna delle 20 nidiata. In 5 nidiata la quantità di siero o di PF raccolta da alcuni soggetti era insufficiente per le analisi; in queste nidiata il numero di suinetti analizzati è stato pari a 2. Nel complesso sono stati quindi esaminati 55 campioni appaiati di siero e PF. Cinquanta dei 55 campioni di siero (90,9%; 95%CI: 80,1-97,0) e 26 dei 55 campioni di PF (47,3%; 95%CI: 33,7-61,2) esaminati sono risultati positivi per anticorpi anti-HEV. Delle 55 coppie di campioni, 26 (47,3%; 95%CI: 33,7-61,2) sono risultate positive in entrambe le matrici biologiche (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati, per ciascuna nidiata, della ricerca di anticorpi anti-HEV nei campioni di siero e di PF e numero di suinetti positivi alla ricerca di anticorpi anti-HEV nel siero e nei PF in ciascuna nidiata. Una nidiata è stata considerata positiva quando almeno 1 dei sieri e/o dei PF esaminati è risultato ELISA positivo alla ricerca di anticorpi di origine materna anti-HEV.

Table 1. Presence of anti-HEV ELISA-positive piglets in paired sera or and processing fluid (PF) within litter and number of anti-HEV ELISA-positive piglets in sera or PF per litter. A litter was considered positive when at least one of the serum and/or PF collected from piglets resulted in ELISA-positive for MDA anti-HEV.

Nidiata n.	Nidiate positive alla ricerca di anticorpi anti-HEV (test ELISA)*		Suinetti positivi alla ricerca di anticorpi anti-HEV (n. positivi/esaminati)	
	siero	PF	sera	PF
1	+	+	3/3	3/3
2	+	+	3/3	2/3
3	+	+	2/2	2/2
4	+	-	2/3	0/3
5	+	-	2/3	0/3
6	+	+	3/3	3/3
7	+	-	1/2	0/3
8	+	+	3/3	1/3
9	+	+	2/2	3/3
10	+	-	1/2	0/2
11	+	+	2/3	2/3
12	+	-	3/3	0/3
13	+	+	3/3	1/3
14	+	+	3/3	2/3
15	+	-	2/2	0/2
16	+	+	3/3	2/3
17	+	+	3/3	3/3
18	+	-	3/3	0/3
19	+	+	3/3	2/3
20	+	+	3/3	1/3
totale positivi	20/20 (100%) 95%CI: 83,2-100	13/20 (65,0%) 95%CI: 40,8-84,6	50/55 (90,9%) 95%CI: 80,1-97,0	26/55 (47,3%) 95%CI: 33,7-61,2

* In tutte le nidiate, almeno 1 suinetto è risultato positivo alla ricerca di anticorpi anti-HEV nel siero.

Risultati del test ELISA a livello individuale e di nidiata

Utilizzando il valore di cut-off indicato dal produttore del test ELISA, è stato evidenziato uno scarso livello di concordanza ($K=0,17$; 95%CI: 0,03-0,30) tra i risultati ottenuti dall'esame dei campioni individuali di siero (50 positivi su 55) e di PF (26 positivi su 55). Utilizzando i risultati dell'esame dei sieri come *gold standard*, la Se relativa dell'esame dei PF è del 52% (95%CI: 37-66) e la Sp relativa del 100% (95%CI: 48-100) (Tabella 2). In tutte le 20 nidiate, almeno 1 dei suinetti esaminati è risultato positivo alla ricerca di anticorpi anti-HEV nel siero. In 13 di queste 20 nidiate, è stato rilevato almeno un campione individuale di PF positivo, con una sensibilità del pool (pSe) del 65% (95%CI: 41-85) (Tabella 3).

Correlazione tra i risultati dell'esame dei campioni individuali di siero e di PF

La correlazione tra i valori di S/Co ottenuti dall'esame dei 55 campioni di siero e PF appaiati è riportato in Figura 1. È stata evidenziata una significativa correlazione positiva (ρ di Spearman: 0,677; $p < 0,01$) tra i risultati ottenuti dall'esame delle due matrici.

Tabella 2. Concordanza tra i risultati dell'esame dei campioni di siero e PF, in funzione dei due valori di cut-off. Gli intervalli di confidenza al 95% sono riportati in parentesi.

Table 2. Agreement between processing fluids (PF) and sera-based HEV ELISA results at the individual level. Se: sensitivity; Sp: specificity. 95% confidence intervals are indicated in brackets.

			anticorpi anti-HEV nel siero (%)		
			positivo	negativo	totale
Cut-off del produttore	anticorpi anti-HEV nei PF	positivo	26 (100)	0 (0,0)	26
		negativo	24 (82,8)	5 (17,2)	29
		totale	50 (90,9)	5 (9,1)	55
			Se: 52% (37-66)	Sp: 100% (48-100)	Kappa: 0,17 (0,03-0,30)
			positivo	negativo	totale
Cut-off calcolato ($\geq 0,271$ S/Co)	anticorpi anti-HEV nei PF	positivo	36 (100)	0 (0,0)	36
		negativo	14 (73,7)	5 (26,3)	19
		totale	50 (90,9)	5 (9,1)	55
			Se: 72% (58-84)	Sp: 100% (48-100)	Kappa: 0,32 (0,09-0,54)

Tabella 3. Concordanza tra i risultati ottenuti, a livello di nidiata, dall'esame con il test ELISA dei PF e dei sieri. Una nidiata è stata considerata positiva quando almeno 1 suinetto aveva un valore di OD nel siero o nel PF superiore al valore di cut-off. Se: sensibilità; Sp: specificità. Gli intervalli di confidenza al 95% sono riportati in parentesi.

Table 3. Agreement between processing fluids (PF) and sera-based HEV ELISA results at the litter level. A litter was considered positive when at least one piglets had a serum or PF OD value > ELISA cut-off. Se: sensitivity; Sp: specificity. 95% confidence intervals are indicated in brackets.

		Nidiate con almeno un suinetto positivo all'esame del siero (%)		
		positivo	negativo	totale
Nidiate con almeno un suinetto positivo all'esame del PF	positivo	13 (100.0)	0 (0.0)	13
	negativo	7 (100.0)	0 (0.0)	7
	totale	20 (65.0)	7 (35.0)	20
		Se: 65% (41-85)	Sp: nc	Kappa: nc

nc: non calcolabile

Figura 1. Correlazione tra i valori S/Co ottenuti dall'esame mediante test ELISA di 55 campioni appaiati di siero e PF.

Figure 1. Scatterplot of the signal-to-cut-off (S/Co) ratio values from individual serum and processing fluids ELISA results in 55 paired samples.

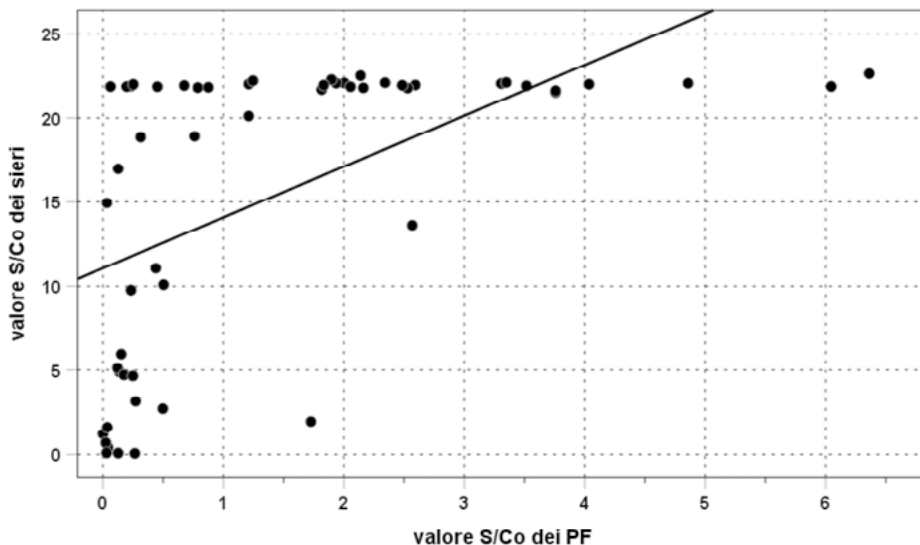


Figura 2. Curva ROC per l'interpretazione dei valori S/Co ottenuti dall'esame mediante test ELISA dei PF. Al valore soglia di $S/Co \geq 0.271$ si ottiene il massimo valore di accuratezza.

Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curve for interpreting S/Co ELISA results in processing fluids. 0.271 was the S/Co threshold value of the processing fluids showing the best accuracy.

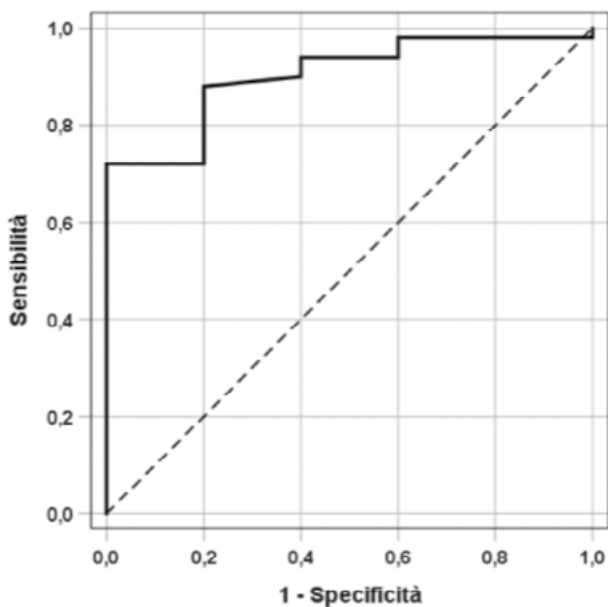


Tabella 4: Risultati dell'esame di pool artificiali di PF ottenuti miscelando campioni individuali di PF positivi con valori di ELISA S/Co alto, medio, medio-basso e basso a un numero crescente (da 3 a 6) di campioni di PF negativi.

Table 4: *Effect of pooling one PF sample with high, medium, medium-low and low ELISA S/Co with 3 through 6 negative PF samples.*

Valori ELISA S/Co nei PF	Diluizione	Numero dei pool positivi /totale pool esaminati	
		Valore di cut-off indicato dal produttore ^a	Valore di cut-off calcolato ^b
alto (S/Co = 6.36)	1:4	1/1	1/1
	1:5	1/1	1/1
	1:6	1/1	1/1
	1:7	1/1	1/1
	totale	4/4	4/4
medio (S/Co = 2.53)	1:4	1/1	1/1
	1:5	1/1	1/1
	1:6	1/1	1/1
	1:7	0/1	1/1
	totale	3/4	4/4
medio-basso (S/Co = 1.73)	1:4	1/1	1/1
	1:5	1/1	1/1
	1:6	0/1	1/1
	1:7	0/1	1/1
	totale	2/4	4/4
basso (S/Co = 1.24)	1:4	0/1	1/1
	1:5	0/1	1/1
	1:6	0/1	1/1
	1:7	0/1	1/1
	totale	0/4	4/4
Totale	1:4	3/4	4/4
	1:5	3/4	4/4
	1:6	2/4	4/4
	1:7	1/4	4/4
	totale	9/16	16/16

^a (media del valore di OD dei sieri negativi di controllo)+0,12; ^b S/Co \geq 0.271

Determinazione del valore ottimale di cut-off per l'interpretazione dei risultati dell'esame dei PF

L'analisi della curva ROC indica che il livello migliore di accuratezza (Area sotto la curva, AUC: 90,2%) tra i risultati dell'esame con il test ELISA del siero e dei PF si ottiene al valore di S/Co dei PF $\geq 0,271$ (Figura 2).

Utilizzando il valore soglia di S/Co $\geq 0,271$, la Se e Sp relativa dell'esame dei campioni di PF è pari, rispettivamente, al 72% (95%CI: 58-84) e 100% (95%CI: 48-100), rispetto ai risultati dell'esame dei campioni individuali di siero. L'accordo tra i risultati dell'esame dei PF e del siero è risultato modesto ($K=0,32$, 95%CI: 0,09-0,54) (Tabella 2).

Nessuna differenza statisticamente significativa (chi-quadrato di Fisher =0,07, $p=1$) è stata evidenziata nella prevalenza di nidiate positive in funzione dell'età delle scrofe (primipare: 3 nidiate positive su 5; pluripare: 10 su 15).

Analogamente, nessuna differenza significativa è stata evidenziata nella prevalenza di sieri o PF positivi in funzione dell'età della scrofa (rispettivamente, chi-quadrato di Fisher =0,63, $p=0,59$ e chi-quadrato di Fisher=0,06, $p=1$).

Limite di rilevabilità del test ELISA nell'esame dei pool artificiali di PF

Utilizzando il valore di cut-off suggerito dal produttore del kit ELISA, è stato possibile ottenere un risultato positivo quando un singolo campione individuale di PF (con un valore S/Co alto, medio o medio-basso) è stato miscelato ad almeno altri 4 campioni di PF individuali negativi. I pool artificiali hanno invece fornito tutti esito negativo quando un campione individuale di PF con valore S/Co basso è stato miscelato con 3, 4, 5 o 6 campioni di PF negativi (Tabella 4).

Utilizzando per l'interpretazione dei risultati il valore di cut-off calcolato (S/Co $\geq 0,271$), tutti i pool artificiali sono risultati positivi (indipendentemente dal numero di PF negativi utilizzati per il loro allestimento) (Tabella 4).

DISCUSSIONE

L'identificazione delle aziende infette da HEV è il presupposto principale per implementare misure efficaci di profilassi nei confronti di questo agente emergente di zoonosi, riducendo così il rischio che prodotti contaminati vengano introdotti nella filiera di produzione della carne suina. La trasmissione di HEV tra i suini è fortemente influenzata dal livello di contaminazione fecale dell'ambiente, il che suggerisce la possibilità di ridurre la prevalenza di animali infetti mediante una corretta gestione dell'azienda, l'applicazione di adeguate misure igieniche (compresa un'efficace pulizia e disinfezione dell'ambiente e delle attrezzature tra i diversi lotti di produzione) e misure di biosicurezza (EFSA, 2017).

L'eliminazione fecale di HEV è limitata nel tempo e fortemente dipendente dall'età dell'animale; ciò influisce sulla possibilità di utilizzare la ricerca dell'RNA virale per valutare la condizione di infezione delle aziende. La ricerca di anticorpi specifici per HEV nei sieri supera i limiti descritti; tuttavia, lo screening sierologico è proibitivo in termini di costi e stressante per gli animali.

Alcune pratiche routinariamente eseguite negli allevamenti suini (es. castrazione) facilitano la raccolta di campioni che possono essere utilizzati per monitorare lo stato delle infezioni (Vilalta *et al.*, 2018). Gli emosieri testicolari (PF) possono essere utilizzati, ad esempio, per monitorare la circolazione di PRRSV (Lopez *et al.*, 2018) o per rilevare la presenza di anticorpi di origine materna nei confronti di altri patogeni nei suinetti neonati. L'esame sierologico dei PF ha numerosi vantaggi rispetto all'esame del siero: la raccolta dei PF non è invasiva e riduce il disagio, lo stress, il dolore e le lesioni all'animale. Inoltre la raccolta dei

campioni di PF è rapida, economica, facile da realizzare e può essere eseguita da personale non veterinario.

Il presente studio ha avuto lo scopo di valutare l'uso dei PF come matrice biologica alternativa al sangue da utilizzare nello screening della presenza di anticorpi anti-HEV nelle aziende con riproduttori. Campioni appaiati di PF e siero di suinetti neonati sono stati analizzati, utilizzando un kit ELISA commerciale per determinare la presenza di anticorpi totali anti-HEV. La presenza di anticorpi anti-HEV è stata rilevata nei PF e una correlazione positiva è stata evidenziata ($\rho=0,677$; $p<0,01$) tra la quantità di anticorpi anti-HEV nei campioni individuali di siero e di PF.

A livello individuale, utilizzando il valore di cut-off indicato dal produttore per confrontare la proporzione di campioni di siero e PF positivi, è stata rilevata una scarsa concordanza ($K=0,17$) tra i risultati ottenuti dall'esame delle due matrici biologiche e una bassa sensibilità relativa (52%) dei risultati dell'esame dei PF. Questo risultato è in linea con quanto riportato da altri studi che hanno evidenziato come la concentrazione di anticorpi nei fluidi biologici (es. *oral fluid* o *meat juice*) sia inferiore rispetto a quella del siero (Nielsen *et al.*, 1998, Olsen *et al.*, 2013). Pertanto, è probabile che anche nei PF la concentrazione di anticorpi anti-HEV sia inferiore rispetto a quella presente nel siero. Come già osservato per il *meat juice* (Nielsen *et al.*, 1998), i PF sono una miscela di siero, linfa e liquidi intracellulari e possono essere considerati una diluizione fisiologica del siero. Pertanto, gli animali che presentano una bassa concentrazione di anticorpi sierici e che forniscono un valore di OD in ELISA appena sopra il valore soglia, possono risultare negativi all'esame dei PF.

Per adattare all'esame dei PF il test ELISA, originariamente messo a punto per la ricerca di anticorpi anti-HEV nel siero, un nuovo valore di cut-off è stato calcolato utilizzando l'analisi della curva ROC.

Utilizzando il valore di cut-off calcolato, i risultati dell'esame con il test ELISA dei campioni individuali di PF hanno un valore di Se e Sp pari al 72% e 100%, rispettivamente, quando comparati con i risultati dell'esame dei sieri individuali. Nonostante ciò, la concordanza tra risultati dell'esame dei PF e quello dei sieri è risultata modesta ($K=0,32$).

Nei suinetti, la quantità di anticorpi assunti con il colostro dipende da numerosi fattori quali, ad esempio, la quantità di colostro disponibile e la quantità di colostro ingerita, la concentrazione di anticorpi nel siero della scrofa e la quantità di quelli assorbiti a livello intestinale, l'ordine di parto e il peso del suinetto (Jenvey *et al.*, 2015, Kielland *et al.*, 2015). Tutti questi fattori, in particolare quelli individuali (ordine di parto e peso alla nascita) devono essere presi in considerazione per aumentare la probabilità di esaminare PF di suinetti con alti livelli anticorpali.

Nessuna differenza significativa ($p>0,05$) nella prevalenza di nidiate positive è stata osservata tra scrofe giovani e anziane, suggerendo che l'età dei riproduttori non abbia nessuna influenza sulla probabilità di rilevare nidiate con almeno 1 soggetto positivo alla ricerca di anticorpi anti-HEV nei PF.

L'uso di pool di campioni permette di esaminare un maggior numero di animali, riducendo i tempi e i costi di diagnosi. Tuttavia, uno dei limiti principali derivanti dall'impiego dei pool è la possibilità che l'eccessiva diluizione dei campioni individuali positivi, porti la concentrazione dell'analita al di sotto della soglia di rilevanza del test, con un conseguente risultato falsamente negativo (De Regge e Cay, 2016, Maherchandani *et al.*, 2004). Per tale motivo, nel presente studio è stato valutato anche l'effetto della diluizione derivante dall'esame di campioni individuali positivi (ad alto, medio, medio-basso e basso titolo anticorpale) miscelati con quantità crescenti di campioni negativi.

I risultati ottenuti indicano che il test ELISA fornisce un risultato positivo quando un PF individuale con una quantità media ($S/Co>2.5$) o alta ($S/Co>6$) di anticorpi anti-HEV è

miscelato con 5 o 6 campioni individuali di PF negativi, rispettivamente. Tuttavia, questo risultato dipende in gran parte dal valore di cut-off utilizzato.

Quando è stato utilizzato il valore di cut-off calcolato attraverso la valutazione della curva ROC, il numero dei pool di PF falsamente negativi diminuisce in quanto vengono identificati come positivi anche i pool artificiali con le diluizioni più elevate di PF positivi. È interessante notare che utilizzando un campione di PF con alto valori di S/Co per creare il pool artificiale, questo risulta positivo fino alla massima diluizione (1:7). Pertanto, supponendo che la quantità di anticorpi materni (MDA) sia anche correlata al livello immunitario della scrofa (Jenvey *et al.*, 2015), con una dimensione media della nidiata di 14 e un rapporto tra sessi di 1:1, la presenza di un singolo suinetto maschio con un alto valore S/Co è sufficiente per identificare la nidiata come positiva.

Utilizzando il valore calcolato di sensibilità dei pool di PF (65%, 13 nidiatae positive delle 20 esaminate, tab. 1), il numero di pool necessario per evidenziare la presenza di scrofe sieropositive per HEV in azienda è estremamente basso. Per esempio, se il pool è costituito da 3 emosieri individuali, l'esame di un minimo di 9 pool è sufficiente per avere il 99% di probabilità di un esito positivo quando la sieroprevalenza è \geq al 30% (Christensen e Gardner, 2000).

I risultati ottenuti indicano che l'esame dei PF può essere utilizzato per rilevare la presenza di infezione da HEV nelle aziende con riproduttori. La ricerca di anticorpi nei PF può rappresentare quindi un metodo rapido, economico e affidabile per valutare la presenza di HEV in questa tipologia di allevamenti, senza causare stress e lesioni agli animali (Vilalta *et al.*, 2018).

È ampiamente riconosciuto che il rischio della presenza di HEV nel fegato degli animali macellati è correlato a due fattori: a) eventuali co-infezione con patogeni ad attività immunodeprimente, in particolare PRRSV e, b) breve periodo di tempo tra l'infezione da HEV e la macellazione. I patogeni intercorrenti possono causare un aumento della durata del periodo di eliminazione fecale di HEV e la cronicizzazione dell'infezione (Salines *et al.*, 2019) mentre alti livelli di immunizzazione passiva possono posticipare l'infezione da HEV di circa 6 settimane (Andraud *et al.*, 2014).

L'esame dei PF può quindi rappresentare un valido strumento per monitorare HEV e PRRSV nelle sale parto, almeno per quanto riguarda la componente maschile delle nidiatae. È importante tenere però in considerazione il fatto che l'esame sierologico dei PF fornisce informazioni relative alla sola condizione immunitaria della scrofa e non del suinetto. Di conseguenza, i campioni di PF possono essere utilizzati allo scopo di evidenziare l'infezione da HEV solo negli allevamenti con riproduttori. Tuttavia, l'esame sierologico dei PF consente di ottenere informazioni relative allo stato sanitario dell'allevamento, utile per pianificare eventuali misure di profilassi e controllo. La successiva valutazione della dinamica di infezione e la sorveglianza dell'esposizione degli animali al virus richiede ulteriori indagini diagnostiche condotte su suini età più avanzata.

Ulteriori studi sono necessari per valutare l'efficacia dell'esame sierologico dei PF come metodo di screening per stimare l'eventuale circolazione di HEV all'interno degli allevamenti. Inoltre, il presente studio è stato condotto in un unico allevamento e non tiene quindi in considerazione eventuali differenze correlate con la tipologia aziendale.

BIBLIOGRAFIA

1. Altman D. G., (1991): Practical statistics for medical research, p. 611. Chapman and Hall, London.
2. Andraud M., Casas M., Pavo N., Rose, N. (2014). Early-life hepatitis e infection in pigs: the importance of maternally-derived antibodies. PLoS one, 9, e105527.

3. Aspinall E.J., Couturier E., Faber M., Said B., Ijaz S., Tivoschi L., Takkinen J., Adlhoch C., on behalf of the country experts (2017). Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Euro surveillance*, 22(26):pii=30561.
4. Casas M., Pujols J., Rosell R., de Deus N., Peralta B., Pina S., Casal J., Martin, M. (2009). Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Veterinary microbiology*, 135, 248-252.
5. Chalupa P., Vasickova P., Pavlik I., Holub M. (2014). Endemic hepatitis E in the Czech Republic. *Clinical infectious diseases*, 58, 509-516.
6. Christensen J., Gardner, I. A. (2000). Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. *Preventive veterinary medicine*, 45, 83-106.
7. De Regge N., Cay B. (2016). Comparison of PRRSV Nucleic Acid and Antibody Detection in Pen-Based Oral Fluid and Individual Serum Samples in Three Different Age Categories of Post-Weaning Pigs from Endemically Infected Farms. *PloS one*, 11, e0166300.
8. EFSA Panel on Biological Hazards: Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M., Davies R., Fernandez-Escamez P.S., Herman L., Koutsoumanis K., Lindqvist R., Nørrung B., Robertson L., Ru G., Sanaa M., Simmons M., Skandamis P., Snary E., Speybroeck N., Ter Kuile B., Threlfall J., Wahlström H., Di Bartolo I., Johne R., Pavio N., Rutjes S., van der Poel W., Vasickova P., Hempen M., Messens W., Rizzi V., Latronico F., Girones R. (2017). Scientific Opinion on the public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal*, 15, 4886, 89 pp.
9. European Union (2009). Council Directive 2008/120/EC of 18 December 2008 laying down minimum standards for the protection of pigs (Codified version). *Official J Europ Union L47:5–13*.
10. Jenvey C.J., Reichel M.P., Cockcroft P.D. (2015). Erysipelothrix rhusiopathiae and Mycoplasma hyopneumoniae: the sensitivities of enzyme-linked immunosorbent assays for detecting vaccinated sows of unknown disease status using serum and colostrum, and the correlation of the results for sow serum, colostrum, and piglet serum. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 27, 211-216.
11. Kamar N., Izopet J., Pavio N., Aggarwal R., Labrique A., Wedemeyer H., Dalton H.R. (2017). Hepatitis E virus infection. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17086.
12. Kielland C., Rootwelt V., Reksen O., Framstad T. (2015). The association between immunoglobulin G in sow colostrum and piglet plasma. *Journal of animal science*, 93, 4453-4462.
13. Kumar S., Subhadra S., Singh B., Panda B.K. (2013). Hepatitis E virus: the current scenario. *International journal of infectious diseases*, 17, e228-233.
14. Lange H., Overbo J., Borgen K., Dudman S., Hoddevik G., Urdahl A.M., Vold L., Sjurseth S.K. (2017). Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. *Epidemiology and infection*, 145, 181-186.
15. Lopez W.A., Angulo J., Zimmerman J.J., Linhares D.C. (2018). Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *Journal of Swine Health and Production*, 26, 146-150.
16. Maherchandani S., Munoz-Zanzi C.A., Patnayak D.P., Malik Y.S., Goyal S.M. (2004). The effect of pooling sera on the detection of avian pneumovirus antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay test. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 16, 497-502.
17. Nielsen B., Ekeröth L., Bager F., Lind P. (1998). Use of muscle fluid as a source

- of antibodies for serologic detection of Salmonella infection in slaughter pig herds. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 10, 158-163.
18. Olsen C., Karriker L., Wang C., Binjawadagi B., Renukaradhya G., Kittawornrat A., Lizano S., Coetzee J., Main R., Meiszberg A., Panyasing Y., Zimmerman J. (2013). Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Veterinary journal*, 198, 158-163.
 19. Pavio N., Doceul V., Bagdassarian E., Johne R. (2017). Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Veterinary research*, 48, 78.
 20. Ponterio E., Di Bartolo I., Orru G., Liciardi M., Ostanello F., Ruggeri F.M. (2014). Detection of serum antibodies to hepatitis E virus in domestic pigs in Italy using a recombinant swine HEV capsid protein. *BMC veterinary research*, 10, 133.
 21. Purcell R.H., Emerson S.U. (2008). Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *Journal of hepatology*, 48, 494-503.
 22. Purdy M.A., Harrison T.J., Jameel S., Meng X.J., Okamoto H., Van der Poel W.H.M., Smith D.B., ICTV Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *The Journal of general virology*, 98, 2645-2646.
 23. Rose N., Lunazzi A., Dorenlor V., Merbah T., Eono F., Eloit M., Madec F., Pavio, N. (2011). High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 34, 419-427.
 24. Salines M., Andraud M., Rose N. (2017). From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Veterinary research*, 48, 31.
 25. Salines M., Dumarest M., Andraud M., Mahe S., Barnaud E., Cineux M., Eveno E., Eono F., Dorenlor V., Grasland B., Bourry O., Pavio N., Rose N. (2019). Natural viral co-infections in pig herds affect hepatitis E virus (HEV) infection dynamics and increase the risk of contaminated livers at slaughter. *Transboundary and emerging diseases*, 66, 1930-1945.
 26. Vilalta C., Sanhueza J., Alvarez J., Murray D., Torremorell M., Corzo C., Morrison R. (2018). Use of processing fluids and serum samples to characterize porcine reproductive and respiratory syndrome virus dynamics in 3 day-old pigs. *Veterinary microbiology*, 225, 149-156.