

PRRSV IN CAMPIONI DI FLUIDO ORALE: STUDIO LONGITUDINALE IN CONDIZIONI DI CAMPO.

DETECTION OF PRRSV IN ORAL FLUID SAMPLES: LONGITUDINAL STUDY UNDER FIELD CONDITIONS.

GRADASSI M., PAVESI R., BONIOTTI B., NASSUATO C., GIOVANNINI S.,
GIACOMINI E., BELLINI S., PACCIARINI M., ALBORALI L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia.

Parole chiave: PRRSV, fluido orale, RT-PCR, suino

Key words: PRRSV, oral fluid, RT-PCR, pig

RIASSUNTO

Il controllo della PRRS in allevamento è un percorso complesso che si deve avvalere di diverse misure ed interventi e che, a causa dell'elevato numero di campioni diagnostici necessari, risulta spesso oneroso. La scelta del fluido orale quale matrice diagnostica sembra oggi rappresentare una promettente alternativa al siero. Scopo di questo lavoro è stato quello di monitorare l'infezione da PRRSV in allevamento attraverso un campionamento longitudinale di sieri, secondo i protocolli diagnostici normalmente in uso, e di confrontare i risultati ottenuti con le indagini effettuate su campioni collettivi di saliva. I nostri risultati, sebbene preliminari, suggeriscono che la sensibilità relativa del test qRT-PCR su fluido orale rispetto al gold standard, PCR individuale su siero, può essere considerata soddisfacente.

ABSTRACT

PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) control in swine farms is an ambitious challenge that has to be based on different measures and intervention plans and that, because of the high amount of diagnostic samples required, is often cost prohibitive. The selection of oral fluid as diagnostic specimen is likely to be a promising alternative to serum. The main purpose of the present experimental study was to monitor PRRSV infection towards a longitudinal sampling of sera, according to the traditional diagnostic protocols, and to match sera with collective pen-based oral fluid results. The preliminary data presented here suggests that the diagnostic sensitivity of the quantitative RT-PCR on oral fluids, compared to the gold standard (RT-PCR on individual serum samples), can be accounted as satisfactory.

INTRODUZIONE

La PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) è stata descritta per la prima volta in USA nel 1987 e, nel giro di pochi anni, è diventata pandemica. Tale sindrome è sostenuta dal PRRSV, virus attualmente classificato come ordine *Nidovirales*, famiglia *Arteriviridae* e genere *Arterivirus*. Una delle principali caratteristiche del virus della PRRS è la sua spiccata variabilità: si riscontrano infatti differenze sempre più significative a livello genomico fra i diversi ceppi, in particolare fra quelli che rientrano all'interno del genotipo europeo (Cay *et al.*, 2008). Crujjsen *et al.*, 2008, hanno osservato che diversi ceppi possono circolare in modo diverso in diversi allevamenti; un determinato ceppo virale può circolare all'interno di un'azienda in una sola fascia d'età e per un breve tempo, quando in un'altra azienda lo stesso

ceppo può persistere per tempi più lunghi ed interessare più fasce della popolazione. Il controllo della PRRS in allevamento è un percorso complesso che si deve avvalere di diverse misure ed interventi; fra gli strumenti principali ricordiamo la gestione aziendale ed in particolare dei gruppi, la vaccinazione, l'acclimatamento, l'applicazione di severe misure di biosicurezza, un programma di controllo attraverso test diagnostici di conferma. Il protocollo diagnostico generalmente adottato si avvale di test sierologici (ELISA) e di esami diretti quali test di biologia molecolare (RT-PCR); tale iter diagnostico può risultare spesso oneroso a causa dell'elevato numero di campioni necessari per il monitoraggio dei diversi gruppi di suini. Si sente oggi l'esigenza di individuare nuove strategie di monitoraggio, che si avvalgano o di pool di campioni di sangue o di matrici alternative rappresentative di gruppi di animali. La scelta del fluido orale è già praticata in medicina umana (Parry *et al.*, 1987; Anon., 1996; Brandtzaeg, 2007; Lima *et al.*, 2009) e sembra oggi rappresentare un'alternativa promettente anche nel settore suinicolo. Il "fluido orale" è costituito dall'associazione di saliva e trasudato mucosale. Mentre quest'ultimo origina dalla mucosa buccale e gengivale e contiene anticorpi sieroderivati, la saliva è prodotta dalle ghiandole parotide, sottomandibolare e sublinguale, oltre che da ghiandole minori (Humphrey e Williamson, 2001; McKie *et al.*, 2002; Prickett *et al.*, 2008).

Il monitoraggio dell'infezione da PRRSV in allevamento per mezzo della saliva è stato oggetto di studi sia in condizioni sperimentali (Prickett *et al.*, 2008a) che di campo (Hoffman *et al.*, 2008; Prickett *et al.*, 2008b). Prickett *et al.*, 2008 hanno dimostrato sperimentalmente che PRRSV è presente nei campioni di fluido orale per circa 4 settimane post-infezione (PI) suggerendo quindi una periodicità di campionamento inferiore a 28 giorni.

Scopo di questo lavoro è quello di monitorare l'infezione da PRRSV in allevamento attraverso un campionamento longitudinale di sieri, secondo i protocolli diagnostici normalmente in uso, e di confrontare i risultati ottenuti con le indagini effettuate su campioni collettivi di saliva.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Sono state selezionate 4 aziende positive per PRRSV con caratteristiche produttive simili.

Azienda 1: azienda a ciclo aperto di 800 scrofe

Azienda 2: azienda a siti di 1800 scrofe

Azienda 3: azienda a siti di 2100 scrofe

Azienda 4: azienda a siti di 1900 scrofe

In ogni azienda sono stati selezionati 4 gruppi di circa 30 – 40 suinetti al momento dello svezzamento distribuiti in differenti box all'interno dello stesso capannone. In ogni gruppo sono stati identificati singolarmente con marca auricolare 10 soggetti e numerati da 1 a 40.

Protocollo di campionamento

I campioni di sangue sono stati prelevati dai singoli suinetti identificati a partire dal giorno dello svezzamento previsto nelle 4 aziende a 21-25 giorni di vita (T0). Hanno fatto seguito altre 3 sessioni con cadenza bi-settimanale, a 5 (T1), 7 (T2) e 9 settimane di vita (T3). Tali campioni, all'arrivo in laboratorio, sono stati centrifugati a 1400 x g per 10 minuti, divisi in aliquote e conservati a -80°C.

I campioni di fluido orale sono stati raccolti durante le medesime sessioni di prelievo attraverso l'ausilio di una fune in cotone del diametro di 18 mm. Le dimensioni della fune

si sono dimostrate idonee ad esclusione del primo campionamento in quanto i suinetti di 21-25 gg mostravano scarso interesse e difficoltà nel mordere la fune. Per ovviare a tale problema, si è stabilito, in occasione del solo primo prelievo, di sfrangiare una delle estremità della corda al fine di rendere più agevole la suzione del materiale di raccolta. Una fune di lunghezza di 40-50 cm veniva quindi appesa alle barre del box in modo da raggiungere l'altezza delle spalle dei suini e veniva lasciata a disposizione dell'intero gruppo per 60 minuti circa. I suini si sono dimostrati attratti dalla fune e durante l'intero tempo di esposizione hanno depositato il fluido orale. L'operatore utilizzando guanti sterili e sostituendoli per ogni gruppo procedeva a recuperare la fune dall'esterno del box, senza entrare in contatto con i suini e a porla all'interno di un sacchetto sterile precedentemente identificato.

All'arrivo in laboratorio, le funi sono state trattate singolarmente con materiale sterile monouso e sottoposte a compressione manuale per permettere il recupero del fluido orale. I campioni di saliva così ottenuti sono stati conservati in congelatore a - 80°C.

Indagini di laboratorio

Al termine delle prove eseguite in ogni azienda tutti i campioni raccolti sono stati sottoposti alle indagini di laboratorio. Nella tabella sottostante dettagliamo gli esami di laboratorio previsti per la ricerca PRRSV nelle diverse matrici.

**TABELLA 1: INDAGINI DI LABORATORIO.
TABLE 1: LABORATORY EXAMS.**

Matrice	RT-PCR singoli (1-40)	RT-PCR pool-box
Sangue	x	
Fluido orale		x

I campioni di siero sono stati analizzati singolarmente; i campioni di fluido orale sono considerati pool in quanto rappresentativi dell'intero gruppo di suini presenti nel box.

La presenza di PRRSV è stata dimostrata tramite tecniche di biologia molecolare. In particolare è stata utilizzata una metodica RT-PCR quantitativa avvalendosi del Kit TaqMan NA/EU PRRSV dell'Applied Biosystem.

Sensibilità del test su fluido orale

Sulla base dei risultati ottenuti è stata calcolata la sensibilità relativa della metodica PCR su saliva rispetto alla PCR su siero individuale. Al fine di individuare la sensibilità di tale test i risultati delle differenti aziende e dei diversi gruppi sono stati considerati unitariamente mantenendo la suddivisione per settimane di vita.

RISULTATI

I grafici di seguito riportati permettono di visualizzare la media dei valori quantitativi dei soggetti qRT-PCR positivi (n° 10) per gruppo (A, B, C, e D) e per campionamento (3, 5, 7 e 9 settimane d'età) e l'esito quantitativo della RT-PCR su fluido orale:

Azienda 1: tutti i campioni di siero e di saliva raccolti a 3, 5 e 7 settimane si sono dimostrati PRRSV positivi tramite tecnica RT-PCR. La PCR su siero individuale è indicativa di un aumento di percentuale di positivi dalle 3 alle 5 settimane e di una progressiva diminuzione dalla quinta alla settimana. A 9 settimane i gruppi B, C e D, negativi alla PCR su siero si sono dimostrati positivi al solo fluido orale.

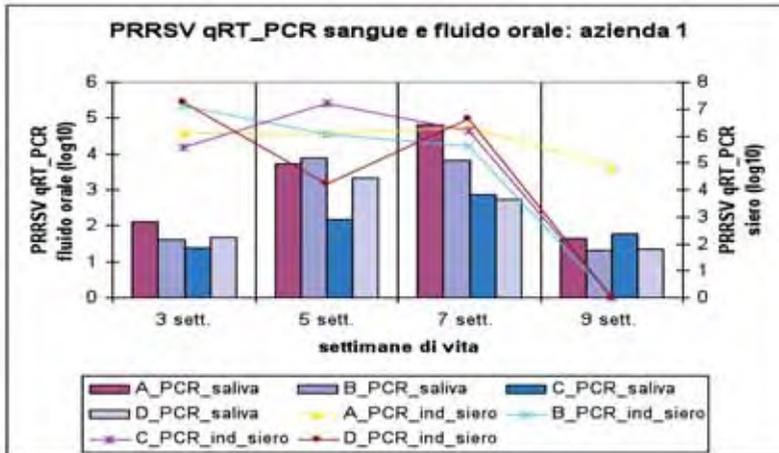


GRAFICO 1: PRRSV QRT-PCR SU SANGUE E FLUIDO ORALE, AZIENDA 1.
GRAPHIC 1: PRRSV QRT-PCR ON SERUM AND ORAL FLUID, FARM 1.

Azienda 2: i campioni di siero appartenenti ai gruppi A e B sono risultati positivi a PRRSV alla 3° settimana di vita mentre i gruppi C e D a partire dalla 5° settimana. Tutti i gruppi si sono mantenuti positivi alla 7 mentre solo i gruppi B e C fino alla 9 settimana. Per quanto riguarda il fluido orale è stata osservata una totale corrispondenza ad eccezione del gruppo B a 9 settimane.

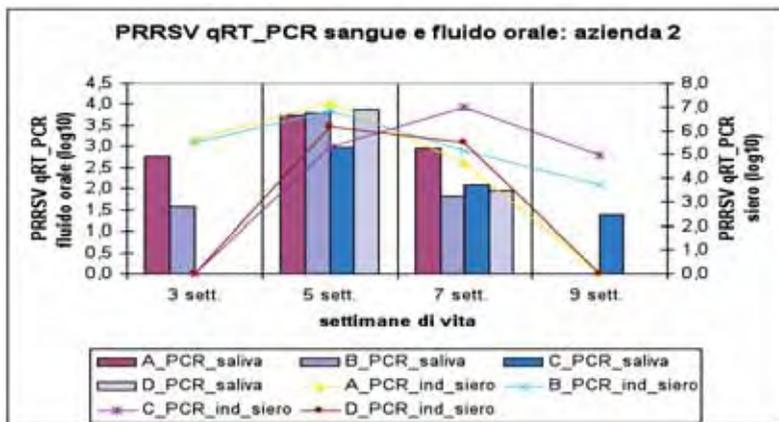


GRAFICO 2: PRRSV QRT-PCR SU SANGUE E FLUIDO ORALE, AZIENDA 2.
GRAPHIC 2: PRRSV QRT-PCR ON SERUM AND ORAL FLUID, FARM 2.

Azienda 3: i campioni di siero dei 4 gruppi sono risultati positivi alle settimane 5 e 7 mentre i gruppi A e B hanno evidenziato positività già a partire dalla 3°. Alla 9 settimana tutti i gruppi erano negativi. Il fluido orale è risultato positivo a partire dalla 5° settimana per poi risultare negativo alla 9°.

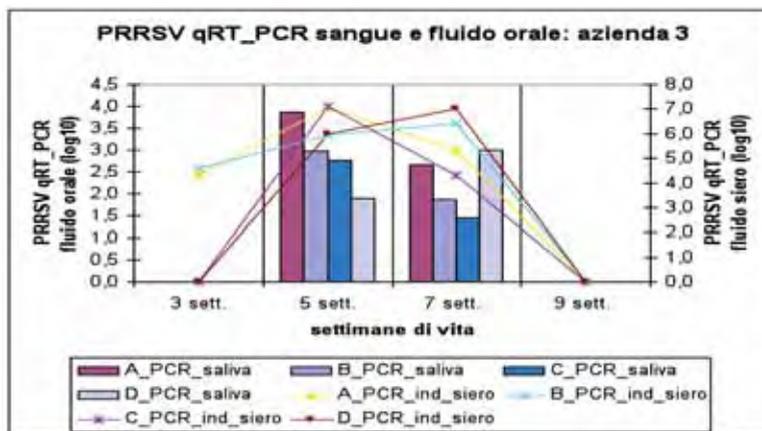


GRAFICO 3: PRRSV QRT-PCR SU SANGUE E FLUIDO ORALE, AZIENDA 3.
GRAPHIC 3: PRRSV QRT-PCR ON SERUM AND ORAL FLUID, FARM 3.

Azienda 4: I campioni di siero sono risultati positivi a partire dalla 5° settimana e sono rimasti tali fino alla 9°. Anche i campioni di fluido orale hanno seguito lo stesso andamento ad eccezione del campione del gruppo C che è risultato positivo per la prima volta alla 7 settimana.

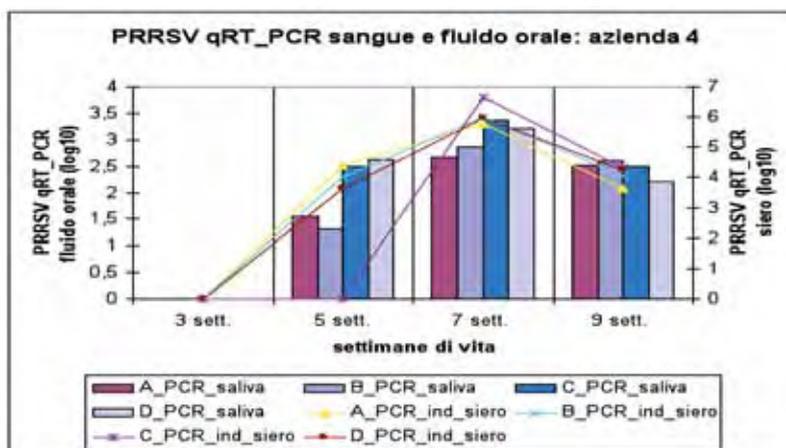


GRAFICO 4: PRRSV QRT-PCR SU SANGUE E FLUIDO ORALE, AZIENDA 1.
GRAPHIC 4: PRRSV QRT-PCR ON SERUM AND ORAL FLUID, FARM 4.

Sensibilità del test su fluido orale

Di seguito viene riportata la Tabella descrittiva della sensibilità relativa del test diagnostico eseguito su saliva rispetto alla PCR su siero individuale considerata gold standard.

TABELLA 2: QRT-PCR DIAGNOSTIC SENSITIVITIVE.

TABLE 2: QRT-PCR DIAGNOSTIC SENSITIVITY.

3 settimane di vita		
% positivi	Se	FNR
50 (28-72)	0,75 (0,43-0,95)	0,25 (0,03-0,65)
5 settimane di vita		
% positivi	Se	FNR
94 (72-99)	1 (0,83-1)	0 (0-0,22)
7 settimane di vita		
% positivi	Se	FNR
100 (79-1)	1 (0,79-1)	0 (0-0,21)
9 settimane di vita		
% positivi	Se	FNR
43 (23-66)	0,86 (0,52-0,99)	0,14 (0-0,58)

DISCUSSIONE

Attualmente, il controllo dell'infezione da PRRSV in allevamento si basa su protocolli diagnostici che richiedono prelievi di sangue individuali o a pool ed un significativo impegno economico. L'eventuale utilizzo del fluido orale quale materiale di indagine rappresentativo di un intero box di suini offre un'alternativa vantaggiosa al fine di monitorare la circolazione virale all'interno di una popolazione.

I dati relativi alle 4 aziende oggetto dello studio confermano che il fluido orale può essere considerato nel suo complesso una valida alternativa al siero. Pur avendo rilevato una buona corrispondenza in alcuni casi è stata riscontrata una difformità tra i risultati delle due matrici in esame. I gruppi B, C, e D dell'azienda 1 alla 9° settimana ed il gruppo C dell'azienda 4 alla 5° settimana sono risultati positivi al solo fluido orale: tale riscontro potrebbe trovare giustificazione anche nella maggiore rappresentatività del campione saliva che, a differenza del siero, coincide con l'intero box di suini. Per contro sono stati riscontrati positivi al siero e non al fluido orale campioni appartenenti a tre gruppi delle aziende 2 e 3 (azienda 2/gruppo B/9° settimana), azienda 3/gruppo A e B/3° settimana). I risultati ottenuti indicano che la sensibilità del test può essere considerata relativamente soddisfacente dimostrando una variabilità compresa tra il 75 e il 100 %.

Per quanto riguarda la specificità del test si è preferito escluderla in quanto i 10 campioni individuali di siero non possono essere considerati rappresentativi in senso assoluto dell'intero box.

I risultati di questo studio di campo devono essere considerati preliminari e necessitano di ulteriori approfondimenti in merito a molteplici aspetti. Fra questi il protocollo di campionamento che necessita di essere affinato nelle modalità di esecuzione tenendo conto del comportamento dei suini in box e della loro effettivo contributo al campione di fluido orale

finale. Le fasi successive quali trasporto e lavorazione del campione andranno considerate con maggior precisione. Ulteriori dati derivanti e da infezione sperimentali da PRRSV in ambiente controllato e da infezioni naturali in campo si rendono necessari al fine di procedere alla validazione dei protocolli di estrazione e di esecuzione della tecnica RT-PCR.

BIBLIOGRAFIA:

1. Anon. (1996): FDA approves first oral HIV antibody test. *AIDS Alert.*, 11: 94
2. Brandtzaeg P. (2007): Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1098: 288-311
3. Cay A., Wellenberg G.J., Kerkhofs P. (2008): Phylogenetic analysis of Dutch and Belgian EU-type PRRSV strains. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June 2008, p. 131.
4. Cruijsen T., Hubert P., Guerts V., Swam H. (2008): Detection of a differentiation between Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome virus strains in the Netherlands. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June 2008, p. 79.
5. Hoffmann P., Prickett J., Main R., Stensland W., Yoon K-J, Sornsen S., Zimmerman J. (2008): Infectious disease surveillance in wean-finish facilities using oral fluids samples. Proceedings, Annual Meeting of American Association of Swine Veterinarians (unnumbered).
6. Humphrey S.P., Williamson R.T. (2001): A review of saliva: normal composition, flow and function. *J. Prosthet. Dent.*, 85: 162-169.
7. Parry J.V. Perry K.R., Mortimer P.P. (1987): Sensitive assays for viral antibodies in saliva: an alternative to tests on serum. *Lancet.*, 2: 72-75
8. Persia D., Pacciarini M.L., Cordioli P., Sala G. (2001): Evaluation of three RT-PCR assays for the detection of *porcine and respiratory syndrome virus* (PRRSV) in diagnostic samples. In: *Proceedings of the X International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, Salsomaggiore-Parma, Italy, p. 440-441.
9. Prickett J., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K-J., Evans R.B., Zimmerman J. (2008a): Detection of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J. Vet. Diag. Invest.*, 20:156-163.
10. Prickett J., Kim W., Simer R., Yoon K-J., Zimmerman J. (2008b): 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.*, 16: 86-91.
11. Lima D.P., Diniz D.G., Moimaz S.A., Sumida D.H., Okamoto A.C. (2009): Saliva: reflection of the body. *Int. J. Infect. Dis.*, ahead of print.
12. McKie A., Vyse A., Marple. (2002): Novel methods for the detection of microbial antibodies in oral fluid. *Lancet. Infect. Dis.* 2:18-24.