

VALUTAZIONE DELLA CONCORDANZA TRA I RISULTATI OTTENUTI DALL'ANALISI DI FLUIDI ORALI E CAMPIONI DI SIERO NEL MONITORAGGIO DELLA PRRS IN SUINETTI SVEZZATI

VIO D.^[1], USTULIN M.^[1], TARGHETTA C.^[1], PIERASCO A.^[1], TOSON M.^[2],
COCCHI M.^[3], TAGLIENTE D.^[1], PASSERA A.^[3], CONEDERA G.^[1]

^[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ~ Cordenons (PN) ~ Italy,

^[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ~ Legnaro (PD) ~ Italy,

^[3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ~ Basaldella di Campofornido (UD) ~ Italy

Keywords: Oral fluids, PRRS, weaned pigs, weaned pigs

Riassunto

I fluidi orali sono, in Italia, una matrice ancora non ampiamente utilizzata, pur avendo ottime potenzialità sia per la ricerca di anticorpi che di agenti eziologici. Nel presente studio il confronto tra campioni di siero e di fluidi orali, prelevati da suini in fase di svezzamento e analizzati per PRRSV mediante PCR, ha dimostrato un'elevata concordanza tra i risultati ottenuti.

Abstract

The use of oral fluids as a sample in swine diagnostic have already proved to be a reliable source of information for the detection of both antibodies and etiological agents. Still, oral fluids are not diffusely used in Italy yet. The aim of our study was to make a comparison between the use of serum and oral fluid as sample in weaned pigs of different ages. The results show a high agreement between the two materials for detection of PRRSV by PCR.

INTRODUZIONE:

I fluidi orali hanno dimostrato di essere una matrice affidabile per la ricerca di anticorpi e di agenti patogeni nell'uomo (2) e in specie di interesse veterinario, incluso il suino (9).

La raccolta di fluidi orali permette di ottenere un campione rappresentativo degli animali presenti nel box sfruttando il naturale comportamento esplorativo dei suini, garantendo inoltre un minore stress per gli animali rispetto al prelievo di sangue (11).

Nonostante i dati bibliografici evidenzino che l'utilizzo dei fluidi orali sia uno strumento adeguato al monitoraggio di diverse patologie virali del suino (7), attualmente tale matrice non è diffusamente utilizzata a fini diagnostici: attualmente i veterinari che prelevano questo tipo di materiale e richiedono analisi su questa matrice sono pochi, così come i laboratori che utilizzano test o kit validati per l'uso su fluidi orali.

Lo scopo di questo studio è stato quello di confrontare i risultati ottenuti dall'analisi per ricerca anticorpi e virus della PRRS in campioni di siero e fluidi orali, raccolti in suinetti svezzati di differenti età. I dati ottenuti hanno permesso di comparare i risultati analitici ottenuti dalla matrice fluidi orali con quelli ottenuti dal siero ematico, considerato matrice d'elezione nell'ambito delle analisi di screening della presenza di PRRSV in allevamento e della relativa diffusione intra-aziendale.

MATERIALI E METODI:

Nel corso dello studio sono stati selezionati 10 allevamenti di suini da riproduzione. In ogni allevamento è stato selezionato un box per ogni età di animali in svezzamento da cui sono stati raccolti un campione di fluidi orali e 5 campioni di siero. Le età degli animali erano

comprese tra 30 e 90 giorni, con una modesta variabilità legata allo specifico management aziendale.

La raccolta dei fluidi orali è stata eseguita utilizzando corde di cotone come descritto in bibliografia (3; 6). In particolare, in ogni box è stata posizionata una corda in posizione tale da ridurre al minimo eventuali contatti con le superfici del box e in modo che l'altezza della corda ne garantisse l'accesso agli animali. La corda è stata lasciata a disposizione degli animali per circa 20 minuti. Al termine del tempo previsto, il fluido orale è stato raccolto sottoponendo la corda, posta in un sacchetto sterile, a torsione e compressione. Successivamente il liquido è stato trasferito in una provetta da 50 ml. I campioni sono stati mantenuti refrigerati fino alla consegna in laboratorio per garantire la stabilità del virus (8). Qualora non fosse possibile iniziare le analisi in giornata i campioni sono stati conservati a -80°C.

Contestualmente da ogni box sono stati selezionati casualmente 5 soggetti e sottoposti a prelievo ematico.

Ciascun campione di fluido orale è stato analizzato con metodica RT-PCR per la presenza di virus della PRRS (5) e per anticorpi anti PRRSV tramite il kit IDEXX PRRS OF Ab test (IDEXX Laboratories Inc.).

L'estrazione dell'RNA virale è stata eseguita sia per i fluidi orali che per i sieri con il Kit High Pure Viral RNA kit (ROCHE). Nel caso dei fluidi orali, prima dell'estrazione si è proceduto a centrifugare 400 µl di fluido a 15000g per 3 minuti e a raccogliere 200 µl del surnatante da sottoporre all'analisi.

I campioni di sangue sono stati testati per anticorpi tramite il kit IDEXX PRRS x3 Ab test (IDEXX Laboratories Inc.) singolarmente e in pool di 5, rispettando la suddivisione in box, e per PRRSV mediante PCR. Le analisi sierologiche sono state eseguite secondo le indicazioni della ditta produttrice dei kit.

I risultati ottenuti sono stati analizzati statisticamente per valutare la concordanza tra le due matrici.

RISULTATI E DISCUSSIONE:

Sono stati raccolti e inclusi nello studio un totale di 47 campioni di fluidi orali e 235 campioni di sangue dalle 10 aziende suinicole da riproduzione selezionate.

29/47 campioni di fluidi orali e 28/47 pool di 5 sieri sono risultati positivi in PCR per PRRSV. 42/47 campioni di fluidi orali e 105/235 campioni di siero sono risultati positivi per la presenza di anticorpi anti PRRSV e, considerando la distribuzione delle positività in base alla suddivisione in box degli animali testati, in 40/47 box è stato identificato almeno un animale positivo. La concordanza fra i risultati delle analisi in PCR nelle due matrici è stata valutata calcolando il test K di Cohen (K) per ogni fascia di età degli animali. Il valore calcolato è risultato significativamente diverso da zero per tutte le età, eccellente per i gruppi di 70 e 90 giorni di età ($K=1$), e buono per i gruppi di 30 e 50 giorni ($K=0,77$).

Il confronto tra le due matrici ha evidenziato una buona concordanza delle analisi in PCR, con un progressivo miglioramento della concordanza con l'aumento dell'età degli animali. I fluidi orali si confermano quindi una matrice adatta al monitoraggio della diffusione del virus della PRRS in allevamento (10).

Nel caso delle analisi sierologiche non è stato possibile calcolare il test K di Cohen per alcune fasce di età, in quanto non erano presenti campioni sia positivi che negativi per entrambe le matrici. Nello specifico tutti i campioni di fluido orale per animali di età pari o superiore a 90 giorni sono risultati positivi e, nelle stesse fasce di età, almeno un animale per box è risultato positivo alle analisi su siero. A 30 giorni tutti i campioni di fluido orale sono risultati positivi mentre da due box su 10 i campioni di siero sono risultati tutti negativi. La concordanza è risultata non significativamente diversa da zero a 50 giorni, ma moderata a 70 giorni di

età. Maggiori difficoltà si riscontrano dunque nel valutare la concordanza delle analisi sierologiche; non è stata infatti possibile la valutazione statistica in alcune fasce di età. Infatti in animali di età pari o superiore a 90 giorni tutti i campioni raccolti sono risultati positivi, presumibilmente a seguito della sieroconversione in un elevato numero di animali. Nel caso degli animali più giovani, ovvero di 30 giorni circa, tutti i campioni di fluidi orali hanno dato esito positivo. L'elevata diffusione di sieropositività è presumibilmente legata alla presenza di anticorpi dovuti all'immunità materna, normalmente ancora presenti a quest'età (12). Nei gruppi di età intermedie la concordanza non mostra valori elevati. Questi risultati, in apparente discordanza con dati bibliografici relativi ad animali stabulati individualmente (4), possono essere legati alla differente composizione di animali inclusi nei due campioni.

In conclusione si evidenziano i principali vantaggi pratici legati all'utilizzo dei fluidi orali come matrice di analisi. Poiché la raccolta di tale matrice non prevede manipolazioni degli animali, si dimostra più rispettosa del benessere animale e meno rischiosa per gli operatori rispetto al prelievo dei singoli campioni di sangue (1), permettendo in tempi ridotti e con minore laboriosità di ottenere un campione rappresentativo degli animali del box.

I risultati del presente studio, associati ai vantaggi elencati riguardo al prelievo dei fluidi orali, confermano l'utilità del prelievo di tale matrice per lo screening della PRRS in allevamento.

BIBLIOGRAFIA:

1. Decorte I., Van Breedam W., Van der Stede Y., Nauwynck H. J., De Regge N., Cay A. B. (2014) "Detection of total and PRRSV-specific antibodies in oral fluids collected with different rope types from PRRSV-vaccinated and experimentally infected pigs" *Veterinary Research* 2014, 10:134.
2. Hutse V., Van Hecke K., De Bruyn R., Samu O., Lernout T., Muyembe J.J., Brochier B. (2010) "Oral fluid for the serological and molecular diagnosis of measles". *International Journal of Infectious Diseases* 14 e991–e997
3. Kittawornrat A., Prickett J., Chittick W., Wang C., Engle M., Johnson J., Patnayak D., Schwartz T., Whitney D., Olsen C., Schwartz K., Zimmerman J.J. (2010) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: Will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance?" *Virus Research* 154 170–176.
4. Kittawornrat A., Engle M., Johnson J., Prickett J., Olsen C., Schwartz T., Whitney D., Schwartz K., Rice A., Ballagi A., Lizano S., Wang C., Zimmerman J.J. (2014) "Detection of PRRSV antibody in oral fluid specimens from individual boars using a commercial PRRSV serum antibody ELISA". *Proceedings of 22nd IPVS Congress, volume II* p. 997.
5. Persia, D., Pacciarini, M., Cordioli, P.S., 2001. Evaluation of three RT-PCR assays for the detection of porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples. In: *Proceedings of the 10th International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology*, pp. 440–441.
6. Prickett J.R., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K.-J., Evans R. B., Zimmerman J. J. (2008a). "Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions" *J VET Diagn Invest* 20: 156 DOI: 10.1177/104063870802000203.
7. Prickett, J.R., 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. *Journal of Swine Health and Production* 16, 86–91.
8. Prickett, J., Cutler, S., Kinyon, J.M., Naberhaus, N., Stensland, W.R., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J. (2010). Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *J. Swine Health Prod.* 18, 187–195.

9. Prickett, J.R., Zimmerman, J.J. (2010). The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Animal Health Research Reviews* 5, 1–10.
10. Ramirez A, Wang C, Prickett JR, Pogranichniy R, Yoon KJ, Main R, Johnson JK, Rademacher C, Hoogland M, Hoffmann P, Kurtz A, Kurtz E, Zimmerman J. (2012). Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev. Vet. Med.* 104:292–300.
11. White D.L., Rotolo M., Olsen C., Wang C., Prickett J.R., Kittawornrat A., Panyasing Y., Main R., Rademacher C., Hoogland M., Zimmerman J.J. (2014) “Pig behavior and the contribution of individual pigs to pen-based oral fluid samples. *Proceedings of 22nd IPVS Congress, volume II* p. 361.
12. Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M., (2006) “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus)” . In: *Diseases of swine 9th edition*, Blackwell Publishing (2006), 387-417.