

# STUDIO SULL'USO DEGLI EMOSIERI TESTICOLARI PER LA DIAGNOSI DI PRRS IN CONDIZIONI DI CAMPO

## STUDY ON USE OF PROCESSING FLUIDS FOR PRRS DIAGNOSIS IN FIELD CONDITIONS

USTULIN M.<sup>1</sup>, TONON F.<sup>2</sup>, LOMBARDO F.<sup>2</sup>, GIORGIUTTI M.<sup>3</sup>, TARGHETTA C.<sup>1</sup>, TOFFOLETTO M.<sup>1</sup>, VIO D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Cordenons (PN)

<sup>2</sup> Suivet s.n.c, Via Martiri della Bettola, 67/8, 42123 Reggio Emilia, Italy

<sup>3</sup> Libero professionista, Pagnacco (UD)

**Parole chiave:** siero di sangue, emosieri testicolari, PRRS

**Keywords:** blood serum, processing fluids, PRRS

### RIASSUNTO

La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) rappresenta ancora oggi una causa di gravi perdite economiche negli allevamenti suinicoli e in particolar modo negli allevamenti da riproduzione. Attualmente la verifica della circolazione di PRRSV su animali in vita è basata prevalentemente sulla ricerca del genoma del virus da campioni di siero di sangue e di fluidi orali. Vi è però interesse nella valutazione di matrici alternative che permettano di limitare stress e manipolazioni soprattutto in animali molto giovani. Una delle matrici che sta destando interesse è l'emosiero testicolare, ovvero il liquido siero-ematico derivante dai testicoli raccolti al momento della castrazione. Nel presente studio il confronto tra questa matrice e il siero di sangue ha mostrato una buona concordanza; l'utilizzo degli emosieri testicolari può tuttavia presentare un maggiore rischio di risultati falsi negativi a seguito di diluizione dovuta all'elevato numero di testicoli da cui deriva il campione da sottoporre ad analisi.

### ABSTRACT

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) causes great economical loss in swine industry, mainly in breeding herds. Analysis to verify PRRS circulation is mainly performed by revealing virus genome on serum samples. The evaluation of sample matrixes that allow to limit animals manipulation, mainly in the youngest piglets, is an important field of interest. One of the new matrixes under evaluation is processing fluids, the liquids extracted from testicles obtained during castration. In the present study the comparison between processing fluids and serum showed a good concordance. Concern lies in the risk of dilution and false negative results from processing fluids due to pooling of too many litters.

### INTRODUZIONE

La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) è, dalla sua comparsa a oggi, una delle più importanti cause di perdite economiche negli allevamenti suinicoli da riproduzione, in termini di aborti, aumento della mortalità e calo delle performance zootecniche.

L'obiettivo primario per il controllo dei danni causati da questa patologia in un allevamento da riproduzione in cui sia presente il virus della PRRS è quello di stabilizzare la scrofaia, ovvero di implementare strategie di controllo della circolazione virale atte da un lato a ridurre le problematiche legate alla sintomatologia riproduttiva e dall'altro a non svezzare

suinetti viremici nel tentativo di ritardare il più possibile il contatto dei nuovi nati con il virus (Holtkamp et al., 2010). A tal fine è importante mantenere alta l'attenzione nelle prime fasi di vita prevedendo protocolli di campionamento e analisi che permettano di poter verificare precocemente la circolazione di virus della PRRS nei suinetti.

Il protocollo di monitoraggio della PRRS attualmente suggerito a livello internazionale consiste nel prelievo mensile di sangue da 30 suinetti scelti casualmente allo svezzamento analizzati in 6 pool da 5 tramite PCR per la rilevazione del RNA virale; un allevamento da riproduzione viene considerato "stabile" nei confronti della PRRS a seguito di 4 campionamenti mensili risultati negativi. Questo piano di campionamento parte dal presupposto che PRRSV non possa permanere in allevamento con una prevalenza inferiore al 10% per più di 90 giorni e che per definire in modo accurato il reale status aziendale sia necessario testare i suinetti sottoscrofa; non sono infatti rari i casi in cui PRRSV è stato rilevato entro breve periodo dall'acquisizione dello status di stabilità aziendale (Prickett et al., 2010) e altrettanto frequenti possono essere situazioni di prevalenza molto bassa dell'infezione in allevamenti endemicamente infetti. Il prelievo di sangue in suinetti di pochi giorni di vita può essere rischioso e rappresenta un evento stressante per i soggetti sottoposti a tale manipolazione; è quindi utile valutare la possibilità di analizzare matrici alternative per la diagnosi precoce.

Una matrice alternativa al siero di sangue di cui si sta diffondendo l'utilizzo è rappresentata dagli emosieri testicolari (Gillespie T.G., 2018), ovvero i liquidi tissutali ottenuti dal percolamento dei testicoli dei suinetti raccolti al momento della castrazione. Per garantire l'attendibilità dei risultati delle analisi effettuate su tali nuove matrici è di estrema importanza verificare che vi sia corrispondenza tra i risultati ottenuti su tali campioni e quelli ottenuti sulle matrici più comunemente utilizzate, nello specifico il siero di sangue.

Il presente lavoro rappresenta un primo confronto della concordanza tra l'uso degli emosieri testicolari e del siero di sangue in condizioni di campo.

## **MATERIALI E METODI**

Il protocollo di campionamento di seguito illustrato è stato applicato in quattro allevamenti da riproduzione selezionati in funzione dello status sanitario nei confronti della PRRS, nello specifico in tre allevamenti erano state rilevate problematiche alla circolazione virale nei suinetti sottoscrofa mentre in un allevamento tale problematica non si rilevava da lungo tempo. Da ciascun allevamento sono state selezionate da cinque a dieci covate con almeno 5 soggetti maschi, le covate sono state scelte in modo da includere scrofe di diverso ordine di parto, comprendendo almeno 3 primipare, al fine di ottenere un campione rappresentativo di tutte le età.

Dai soggetti maschi selezionati in ogni covata è stato effettuato un prelievo di sangue. Dei due testicoli di questi soggetti uno è stato utilizzato per costituire un pool di testicoli formato dai soli soggetti selezionati e uno è stato incluso in un secondo pool costituito dai testicoli di tutte le covate (1 testicolo per soggetto).

Dopo la raccolta tutti i campioni sono stati conservati a temperatura di refrigerazione e conferiti al Laboratorio di Diagnostica Clinica della Sezione di Pordenone entro 24 ore dal prelievo.

I sieri sono stati processati in pool di 5 rispettando la suddivisione per covata, in modo da mimare l'attuale sistema di campionamento.

Tutti i campioni sono stati sottoposti a rilevazione del virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRSV) mediante retro-trascrizione e amplificazione dell'acido nucleico con Kit Realtime LSI VetMax™ PRRSV EU/NA Life Technologies™.

L'analisi degli emosieri testicolari derivanti dal pool di 5 testicoli dei soggetti selezionati è stata eseguita allo scopo di verificare la corrispondenza delle due matrici nell'analisi degli stessi individui (pool di sieri contro emosieri testicolari).

Le analisi dei testicoli dei pool di più covate sono state condotte con lo scopo di mettere a confronto non solo le due diverse matrici ma anche i due metodi di campionamento. I risultati ottenuti sono stati confrontati tramite il calcolo della *kappa* di Cohen a valutazione della concordanza tra emosieri testicolari e pool di sieri considerato Gold Standard.

## **RISULTATI**

Come premesso, i campioni previsti dalla studio sono stati prelevati in 4 allevamenti, denominati A, B, C, e D; negli allevamenti A, B, e C era stata rilevata recentemente la circolazione virale nei suinetti sottoscrofa, al contrario tale evenienza non si rilevava da lungo periodo nell'allevamento D.

Nell'allevamento A sono state oggetto di campionamento le nidiatae di 5 scrofe; sono risultati contemporaneamente positivi i pool di sieri e i corrispettivi emosieri testicolari dei suinetti di una delle 5 nidiatae; in questo allevamento è risultato positivo il pool totale di tutti gli emosieri di tutte le nidiatae (25 soggetti).

Nell'allevamento B su 10 nidiatae incluse nel campionamento, una nidiata è risultata positiva sia all'analisi del pool di sieri che al pool dei corrispettivi emosieri testicolari; una nidiata è risultata positiva solo all'analisi del pool degli emosieri testicolari mentre il pool costituito dagli emosieri testicolari delle 10 nidiatae (50 soggetti) è risultato negativo.

Nell'allevamento C, 2 dei 10 pool di sieri sono risultati positivi mentre non sono state rilevate positività a carico degli emosieri corrispondenti; anche il pool di emosieri testicolari comprendente le 10 nidiatae (50 soggetti) è risultato negativo. Tenuto conto della difformità dei risultati ottenuti e in ragione della vaccinazione con virus vivo attenuato dei suinetti oggetto di studio avvenuta 4-5 ore prima, si è proceduto a sequenziare ORF 5 e ORF 7 del virus identificato; il confronto delle sequenze di ORF 5 e ORF 7 con le sequenze vaccinali corrispondenti ha permesso di evidenziare che il virus identificato corrispondeva con il virus vaccinale.

Nell'allevamento D, nel quale non si rilevava da tempo circolazione di PRRSV nei suinetti sottoscrofa, sono state campionate 7 nidiatae; in quest'ultima azienda sia pool di sieri dei 5 suinetti selezionati per scrofa che i corrispettivi pool di emosieri testicolari sono risultati negativi, anche nel pool di emosieri testicolari corrispondente a tutte le nidiatae (35 soggetti) non è stata rilevata la presenza del virus della PRRS.

I risultati ottenuti sono raccolti in tabella 1.

Azienda	n°	Risultato sieri	Risultato emosieri	Risultato pool
A	1	Neg	Neg	Pos (Ct=26,08)
A	2	Neg	Neg	
A	3	Neg	Neg	
A	4	Neg	Neg	
A	5	Pos (Ct=31,07)	Pos (Ct=22,53)	
B	1	Neg	Neg	Neg
B	2	Neg	Neg	
B	3	Pos (Ct=36,05)	Pos (Ct=35,93)	
B	4	Neg	Neg	
B	5	Neg	Neg	
B	6	Neg	Neg	
B	7	Neg	Neg	
B	8	Neg	Pos (Ct=37,92)	
B	9	Neg	Neg	
B	10	Neg	Neg	
C	1	Neg	Neg	Neg
C	2	Neg	Neg	
C	3	Neg	Neg	
C	4	Neg	Neg	
C	5	Pos (Ct=35,81)	Neg	
C	6	Pos (Ct=33,67)	Neg	
C	7	Neg	Neg	
C	8	Neg	Neg	
C	9	Neg	Neg	
C	10	Neg	Neg	
D	1	Neg	Neg	Neg
D	2	Neg	Neg	
D	3	Neg	Neg	
D	4	Neg	Neg	
D	5	Neg	Neg	
D	6	Neg	Neg	
D	7	Neg	Neg	

**Tabella 1:** Risultati  
*Table 1: Results*

Il calcolo dell'indice K di Cohen ha evidenziato una concordanza moderata tra le due matrici (K=0,520); la concordanza si eleva a buona, secondo la scala di Landis e Koch, se si esclude la positività data dalla vaccinazione (K=0,783).

	Pos sieri	Neg sieri	
Pos emosieri	2	1	3
Neg emosieri	2	27	29
	4	28	32

**Tabella 2:** Matrice per il calcolo dell'indice K di Cohen

**Table 2:** Matrix for Cohen K evaluation

## DISCUSSIONE

Il confronto tra i campioni di siero di sangue ed emosiero testicolare prelevati dagli stessi soggetti ha mostrato una buona concordanza.

I risultati ottenuti analizzando in pool tutte le nidiate dell'allevamento B (pool di 5 soggetti per 10 nidiate per un totale di 50 soggetti) suggeriscono che questo metodo di campionamento possa portare ad eccessiva diluizione del campione e ad ottenere, di conseguenza, risultati falsamente negativi nel caso in cui i titoli virali siano bassi evidenziati dai valori di Ct elevati. Questo dato conferma quanto già osservato in alcuni studi presenti in letteratura (Sol e Jansen, 2018; Vilalta et al., 2018).

Un'altra considerazione da fare è legata alla presenza di un campione di emosieri testicolari di una singola covata (5 soggetti) risultato positivo mentre il pool di 5 sieri corrispondenti è risultato negativo. Questo dato può suggerire una maggiore sensibilità del campione di emosieri testicolari a fronte di una corrispondenza dei soggetti analizzati, ipotesi supportata anche dal fatto che nella nidiate positiva dell'azienda A il valore di Ct del pool di emosieri è risultato più basso, a indicazione di una maggiore carica virale.

## CONCLUSIONI

La possibilità di utilizzare a fini diagnostici un materiale di scarto di un'attività di routine negli allevamenti suinicoli per il monitoraggio della PRRS, rappresenta un indubbio vantaggio in quanto permette di evitare un'ulteriore manipolazione stressante per i suinetti sottoscrofa, categoria di animali nella quale il prelievo di fluidi orali non permette la raccolta di sufficiente materiale da sottoporre ad analisi. I risultati ottenuti confermano che è possibile utilizzare gli emosieri testicolari come matrice d'analisi per la diagnosi di PRRS in suinetti sottoscrofa. Il ricorso all'utilizzo di campioni aggregati nel monitoraggio delle malattie infettive, quali per esempio tamponi ambientali, campioni di aria e, non da ultimo, fluidi orali è sempre più frequente e rappresenta una valida modalità di massimizzare la resa dei costi derivanti dalle analisi di laboratorio. Tenuto conto del costo delle singole analisi è evidente che tramite la raccolta di campioni aggregati di tessuti provenienti da un numero elevato di soggetti è possibile limitare la spesa relativa. Il costo derivante dalle analisi per il monitoraggio della PRRS nei suinetti sottoscrofa utilizzando un campione "di convenienza" costituito da 30 prelievi di sangue di suinetti costituenti a loro volta 6 pool di siero ha un costo di circa 130 € che potrebbero essere utilizzati per le analisi di 6 emosieri testicolari aumentando notevolmente la rappresentatività del campione.

In ragione degli aspetti epidemiologici intra-aziendali specifici della PRRS, la nuova matrice

oggetto di questo studio, qualora utilizzata con regolarità, può rappresentare un utile strumento per la diagnosi precoce dei casi di recrudescenza e può essere di notevole ausilio diagnostico per la rilevazione di PRRSV nelle aziende in cui la prevalenza virale è prossima allo zero.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Gillespie T.G. “Novel PRRSV detection technique used as a part of a PRRSV elimination program”. 25th IPVS Proceedings Volume 1, p. 166, 11-14 Giugno 2018, Chongqing, Cina.
2. Holtkamp D.J., Polson D.D., Torremorell M., Morrison B., Classen D.M., Becton L., Henry S., Rodibaugh M.T., Rowland R.R., Snelson H., Straw B., Yeske P., Zimmerman J. (2010). Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. *J Swine Health Prod.* 2011;19(1):44-56.
3. Prickett JR, Zimmermann JJ. The development of oral fluid-based diagnostic and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res Rev.* 2011; 11(2): 207-216.
4. Sol R., Jansen R. “The use of processing fluids compared to serum for determination the PRRS type 1 status of neonatal piglets on a commercial Dutch farm”. 25<sup>th</sup> IPVS Proceedings Volume 1, p. 166, 11-14 June 2018, Chongqing, Cina.
5. Vilalta C., Sanhueza J., Alvarez J., Murray D., Torremorell M., Corzo C., Morrison R. “Use of processing fluids and serum samples to characterize porcine reproductive and respiratory syndrome virus dynamics in 3 day-old pigs” *Veterinary Microbiology* 225 (2018) 149-156 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.006>