

RISULTATI PRELIMINARI DI CONFRONTO TRA DIFFERENTI PROTOCOLLI DIAGNOSTICI PER IL MONITORAGGIO DELLA PRRSV NEI SUINETTI SOTTOSCROFA

PRELIMINARY RESULTS OF COMPARISON BETWEEN DIFFERENT DIAGNOSTIC PROTOCOLS FOR PRRSV MONITORING IN SUCKLING PIGLETS

TONNI M.¹, MAISANO A.M.¹, BONIOTTI M.B.¹, OSTANELLO F.², LEOTTI G.³,
SCALI F.¹, SANTUCCI G.¹, ANDREONI S.³, ALBORALI G.L.¹

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna,
Brescia;*

² *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie – Università di Bologna;*

³ *Boehringer Ingelheim Italia AH – Milano.*

Parole Chiave: PRRSV, monitoraggio, emosieri testicolari

Key Words: PRRSV, monitoring, processing fluids

RIASSUNTO

Questo studio si è posto come obiettivo la valutazione di un metodo alternativo alla analisi biomolecolare del siero ematico come materiale diagnostico routinario per il controllo della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS). Il nuovo materiale utilizzato corrisponde al liquido biologico percolato da pool di testicoli asportati al momento della castrazione, chiamato emosiero testicolare (ET). Dai suinetti sottoscrofa sono stati raccolti campioni di sangue (414) e pool di ET (71) in 4 allevamenti suinicoli del Nord Italia, successivamente analizzati con RT-PCR real time. I risultati ottenuti dal confronto hanno evidenziato un indice di Concordanza del 97,2% e un valore della k di Cohen dello 0,92 (IC95%: 0,81-1,00) in linea con quanto riportato in letteratura. Considerando i campioni raccolti su sangue come materiale di riferimento sono stati calcolati i valori di sensibilità pari all'88,2% (IC95%: 63,6-98,5%) e specificità del 100% (IC95%: 93,4-100%). L'utilizzo degli ET è da considerarsi una valida alternativa all'impiego del siero ematico nei protocolli di monitoraggio della PRRS, dato l'elevato grado di concordanza con la metodica di riferimento. Inoltre, l'uso di ET è preferibile poiché prevede il campionamento di materiale biologico di "scarto", facile da campionare, con un minimo spreco di materiali consumabili, tempo e risorse. Questa soluzione è inoltre vantaggiosa poiché non sottopone i suinetti ad ulteriori procedure stressanti comportando difatti un minor impatto sul benessere animale.

ABSTRACT

Swine porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a widespread disease, which requires proper monitoring tools. Aim of this study was the evaluation of an alternative method to blood serum samples for the routine biomolecular analysis of PRRS. The proposed material, known as processing fluids (PF), is a biological liquid leached from testicles taken during castration. Blood samples (n=414) and PF (n=71) were collected from suckling piglets in four farrow-to-weaning farms in North of Italy and, subsequently, analysed by RT PCR real time. Results showed a Concordance Index of 97.2% and Cohen's kappa statistic of 0.92 (CI95%: 0.81-1.00). Considering blood samples as reference material, sensibility and specificity of PF sampling were 88.2% (CI95%: 63.6-98.5%) and 100% (CI95%: 93.4-100%) respectively. The results of this

study, as well as data available in literature, suggest that PF samples should be considered a viable alternative of blood serum samples in PRRS monitoring protocols. Furthermore, PF provide several advantages such as: recycle of “waste” biological material, low supply consumption, easy and fast sampling. Finally, PF represent a convenient solution for animal welfare too because sampling PF could avoid stressful procedures for piglets.

INTRODUZIONE

L'agente eziologico della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) è un virus RNA a catena positiva della famiglia Arteriviridae (PRRSV) ed è presente nella maggior parte degli allevamenti di suini italiani. La frequenza dei casi di malattia è variabile ma ad oggi rimane una delle principali cause di perdite economiche. La manifestazione clinica della PRRS è strettamente collegata all'età dei suini, le scrofe soffrono di problemi riproduttivi che possono evidenziarsi mediante aborti epidemici, mummificazioni fetali e natimortalità, nei verri si osserva invece una diminuzione della fertilità. I sintomi della sindrome respiratoria nei suini svezzati e nei magroni sono: febbre, tosse, dispnea, congiuntivite, anoressia, rallentamento della crescita, letargia a cui si possono associare infezioni batteriche secondarie che contribuiscono all'aumento della mortalità (Jeffrey et al., 2012). Un aspetto critico per il controllo della malattia è l'interruzione del ciclo di trasmissione in scrofaia con la produzione di suini svezzati PRRSV-free (Corzo et al., 2010), questo obiettivo viene raggiunto con un monitoraggio routinario continuo e l'applicazione di protocolli immunologici. Attualmente il Gold standard per il monitoraggio consiste nel controllo mensile mediante PCR su siero ematico di suinetti prima dello svezzamento (Holtkamp et al., 2011). Un tipico protocollo prevede di testare 30 soggetti suddivisi tra inizio, metà e fine lattazione e per ogni fase vengono scelte 5 nidiate di primipare e 5 di pluripare da cui prelevare un singolo suinetto. Con questa procedura i risultati sono attendibili, tuttavia può comunque capitare di registrare una prevalenza prossima allo zero in allevamenti endemicamente infetti (Linhares, 2013). Ai fini di un monitoraggio continuo per PRRSV sono stati descritti in letteratura molti protocolli diagnostici che prevedono la raccolta di vario materiale biologico. La raccolta di fluidi orali è un altro metodo che consente di avere un campione più rappresentativo dell'allevamento ma non è funzionale per i suinetti sottoscrofa. Un nuovo metodo che sta iniziando ad essere applicato e che richiede degli approfondimenti è l'utilizzo dei cosiddetti emosieri testicolari (ET), ovvero il liquido biologico recuperato da un pool di testicoli asportati al momento della castrazione. Per la prima volta nel 2018 la relazione annuale dello Swine Disease Reporting System che illustra i dati sul monitoraggio della maggior parte degli allevamenti suinicoli statunitensi ha riportato un consistente incremento dell'uso di ET finalizzato al controllo della PRRS. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'utilizzo degli ET come strumento per il monitoraggio della PRRS nel sistema produttivo italiano, tramite un confronto con la metodica di riferimento.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Lo studio ha considerato 4 allevamenti da riproduzione dislocati in Nord Italia che operavano già il monitoraggio della PRRS mediante prelievo ematico nei suinetti sottoscrofa. Sono stati scelti in modo casuale alcune nidiate da sottoporre al prelievo ematico ed alla contemporanea raccolta dei testicoli al momento della castrazione, secondo la numerosità riportata in Tabella 1 e con la corrispondenza di un pool per ogni nidiate.

Tabella 1. Distribuzione dei campioni prelevati in 4 allevamenti.
Table 1. *Distribution of samples collection in 4 farrow-to-weaning farms.*

	N° scrofe	N° suinetti	N° pool emosieri testicolari	N° prelievi sangue
Azienda 1	15	108	15	108
Azienda 2	16	68	16	68
Azienda 3	20	128	20	128
Azienda 4	20	110	20	110
Totale	71	414	71	414

Prelievo dei campioni

In ogni allevamento è stata mantenuta la normale routine di castrazione per quanto riguarda l'uso di guanti e taglianti, al fine di mantenere una situazione di campo. I soggetti selezionati sono stati sottoposti prima al prelievo ematico in singolo e successivamente alla castrazione chirurgica, il materiale derivante è stato raccolto in sacchetti di polietilene da 5 litri nuovi non sterili, ottenendo un pool per ogni nidiata, da cui andare e prelevare il cosiddetto emosiero. Tutto il materiale biologico è stato mantenuto a temperatura di refrigerazione (4°C).

Indagini di laboratorio

Gli emosieri ed il sangue sono stati portati in laboratorio entro 2 ore dal prelievo e dal fondo del sacchetto, con una siringa sterile è stato prelevato il materiale siero-ematico che nel frattempo si è raccolto. Per ottenere dai pool meno consistenti una quantità pari ad almeno 1ml di ET è stato necessario porre il campione in Stomacher® per 3 minuti a 230rpm. I campioni di sangue sono stati centrifugati a 3000rpm per 3' ed è stato raccolto il siero surnatante. L'ET ed il siero ematico sono stati aliquotati in contenitori Eppendorf® da 1,5 ml e refrigerati fino al momento dell'esecuzione dei test diagnostici. L'RNA è stato ottenuto a partire da 200 µl di campione utilizzando il kit NucleoMag® Vet kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) mediante estrazione automatica con Biosprint 96 instrument (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le istruzioni del produttore.

La ricerca di PRRSV è stata eseguita tramite RT-PCR real time utilizzando il kit LSI VetMAX (TM) PRRSV EU/NA Real-Time PCR kit (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy), secondo le indicazioni del produttore. I risultati sono stati interpretati valutando il valore del Ciclo soglia (Ct) e considerati positivi nel caso di Ct ≤37. Per poter confrontare gli ET (nidiate in pool) con i sieri ematici (suinetti in singolo), una nidiata è stata considerata positiva se almeno il siero ematico di un soggetto presentava positività in PCR.

Analisi statistica

I risultati di PCR sono stati valutati mediante una tabella di contingenza (2x2) in cui sono stati messi a confronto lo status delle nidiatae, basandosi sui risultati della PCR su siero ematico (analisi effettuate in singolo e valutate come positive o negative sulla nidiata) e degli ET di tutte le nidiatae analizzate. Il confronto è stato eseguito mediante l'Indice di Concordanza e il valore della K di Cohen. Sensibilità e specificità sono state calcolate considerando come Gold standard i risultati ottenuti nelle nidiatae dai sieri ematici.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In tre dei quattro allevamenti è stato riscontrato l'RNA del PRRSV, evidenziando difatti un'attiva circolazione virale, i risultati riferiti alle singole nidiatae sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Status delle nidiatae per PRRSV: confronto tra il risultato della RT-PCR real time del siero ematico (Gold standard) e dell'emosiero testicolare (ET) nei suinetti.

Table 2. *PRRSV litters status: comparison of the RT PCR real time results between blood serum (Gold standard) and processing fluids (PF) in piglets.*

		RT-PCR real time siero ematico	
		+	-
w emosiero	+	15 (100%)	0 (0%)
	-	2 (3,6%)	54 (96,4%)

Le 71 nidiatae esaminate hanno dimostrato una concordanza tra i due test del 97,2% con un valore della k di Cohen dello 0,92 (IC95%: 0,81-1,00), valore considerato ottimale e in accordo con quanto rilevato da Vilalta e coll. (2018).

Sensibilità e specificità del test sono risultate rispettivamente dell'88,2% (IC95%: 63,6-98,5%) e del 100% (IC95%: 93,4-100%), evidenziando quindi una modesta perdita di sensibilità dell'esame in pool su ET rispetto ai sieri analizzati in singolo; risultati concordi con quanto riportato da altri autori in un recente lavoro, che hanno riportato un valore di sensibilità dell'87% (IC 95%: 66-97%) e di specificità del 94% (IC95%: 85-99%) (Vilalta et al., 2018).

La perdita di sensibilità è verosimilmente attribuibile ad una diluizione del virus nei campioni in pool dovuto ad una bassa carica virale (Vilalta et al., 2018). Inoltre, la raccolta degli ET in pool potenzialmente consente di avere un campione rappresentativo di più soggetti rispetto alla raccolta di siero ematico (seppur anch'esso in pool). Inoltre, la possibilità di costituire pool da nidiatae differenti, o da un numero di suinetti campionati maggiore, può comportare un rialzo delle positività conseguente ad un probabile aumento del livello di sensibilità (maggiore numero di soggetti campionati), come riportato nello Swine Disease Reporting System (2018).

Il confronto tra i principali protocolli di monitoraggio della PRRS basati sull'esecuzione di 6 PCR mensili su siero ematico raccolto in pool di 5 suinetti e la proposta di utilizzo dei pool di ET (Tabella 3) mostra come a parità di suinetti campionati sia possibile eseguire un numero inferiore di campioni con medesima attendibilità. Si evidenzia come il campionamento di materiale biologico di "scarto" (testicoli), può ridurre il materiale consumabile necessario e le tempistiche per l'esecuzione dei campioni. Inoltre, il campionamento per ET non prevede l'esecuzione di un prelievo ematico eseguito da un

veterinario adjuvato da un operatore che contiene l'animale, ma risulta sufficiente porre in sacchetti diversi i testicoli al momento della castrazione, eseguita da un operatore appositamente formato (risparmio di risorse). Infine, il protocollo ET evita un'ulteriore procedura stressante per i suinetti, quale manipolazione, contenimento e prelievo ematico, riducendo conseguentemente l'impatto sul benessere animale.

Tabella 3. Confronto tra i protocolli per il monitoraggio della PRRS.

Table 3. Comparison between PRRS monitoring protocols.

Protocollo	N° suinetti / nidiate	N° nidiati mensili	N° suinetti / anno	N° soggetti / pool	N° campioni / anno	N° analisi PCR / anno
Prelievi ematici in singolo (Metodica di riferimento)	5	30	360	-	360	360
Prelievi ematici in pool	5	30	360	5	360	72 (6 pool da 5 suinetti/mese)
Emosieri testicolari in pool	5	30	360	5	72	72 (6 pool da 5 suinetti/mese)

CONCLUSIONI

I risultati preliminari di questo studio sul confronto, tra l'impiego di sieri ematici in singolo rispetto agli ET in pool, forniscono una valida indicazione sulla possibilità dell'uso di ET nei suinetti come valida alternativa di campionamento, evidenziato da un'eccellente concordanza dei risultati. Tuttavia, questi confronti dovranno essere estesi ad un numero maggiore di campioni per poter validare il protocollo diagnostico. L'impiego di ET risulta preferenziale, poiché prevede il campionamento di materiale biologico di "scarto", facile da prelevare, con un minimo spreco di materiali consumabili, tempo e risorse. Inoltre, l'uso del protocollo con ET non prevede ulteriori misure stressanti per i suinetti impiegate per i prelievi siero-ematici (manipolazione dei suinetti ed esecuzione del prelievo), riducendo l'impatto sul benessere animale. In conclusione, l'utilizzo di ET nel protocollo diagnostico di monitoraggio del PRRSV risulta la metodica promettente di più facile utilizzo su larga scala.

BIBLIOGRAFIA

1. Corzo, C. A., E. Mondaca, S. Wayne, M. Torremorell, S. Dee, P. Davies, and R. B. Morrison, 2010, Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: *Virus Res*, v. 154, p. 185-92.
2. Holtkamp, D. J., D. D. Polson, M. Torremorell, B. Morrison, D. M. Classen, L. Becton, S. Henry, M. T. Rodibaugh, R. R. Rowland, H. Snelson, B. Straw, P. Yeske, J. Zimmerman, A. A. o. S. Veterinarians, and U. S. D. o. A. P.-C. A. Project, 2011, [Terminology for classifying the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) status of swine herds]: *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, v. 39, p. 101-12.

3. Iowa, S. U., and U. Minnesota, 2018, Swine disease reporting system.
4. Jeffrey, J. Z., A. B. David, A. D. Scott, P. M. Michael, S. Tomasz, W. S. Gregory, and T. Montserrat, 2012, Diseases of Swine, Wiley-Blackwell Ames.
5. Linhares, D. C. L., 2013, Evaluation of Immune Management Strategies to Control and Eliminate Porcine
6. Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSv), University of Minnesota, Saint Paul.
7. Vilalta, C., J. Sanhueza, J. Alvarez, D. Murray, M. Torremorell, C. Corzo, and R. o. Morrison, 2018, Use of processing fluids and serum samples to characterize porcine reproductive and respiratory syndrome virus dynamics in 3 day-old pigs: Veterinary Microbiology, p. 149-156.