

CONFRONTO TRA L'UTILIZZO DI EMOSIERI TESTICOLARI E DI SANGUE NEL MONITORAGGIO DELLA PRRSV IN ALLEVAMENTI DA RIPRODUZIONE

COMPARISON BETWEEN PROCESSING FLUIDS AND BLOOD SAMPLES FOR PRRSV MONITORING IN BREEDING HERDS

TONNI M.¹, BONIOTTI M.B.¹, OSTANELLO F.², LEOTTI G.³, BIANCHI M.³, 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 AH Italia - Milano.*

Parole chiave: PRRSV, emosieri testicolari

Key words: PRRSV, processing fluids

RIASSUNTO

L'utilizzo degli emosieri testicolari (EST) per il monitoraggio della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) in allevamenti da riproduzione è sempre più diffuso. Lo scopo di questo studio era quello di operare un confronto tra il monitoraggio longitudinale della PRRSV basato su campioni di sangue e di EST. Tutti i campioni sono stati raccolti in 10 allevamenti con un campionamento ogni 3 settimane, durante 5 mesi di studio. Gli EST sono stati raccolti con procedure standardizzate in pool di 10-15 nidiati con una dimensione omogenea del campione. Per ogni banda, sono stati poi raccolti 30 campioni di sangue prima dello svezzamento. Tutti i campioni sono stati sottoposti a PCR real-time per la ricerca del PRRSV. La presenza di almeno un campione positivo era sufficiente per identificare lo status di positività. È stato confrontato lo status di ogni banda in base ai risultati ottenuti dalle due matrici biologiche analizzate. Quarantacinque delle 64 bande, analizzate hanno mostrato lo stesso status. Al contrario, 19 bande erano discordanti. Ulteriori dati forniti dalle tre aziende con una routine settimanale hanno confermato lo status identificato dagli EST. Un'analisi più approfondita di questi risultati rivela la veridicità di entrambi i test, gli EST evidenziano la situazione dei suinetti a 3-4 giorni di vita, i campioni di sangue rappresentano la situazione in pre-svezzamento, con un possibile cambiamento della viremia. Pertanto, gli EST rappresentano una popolazione più ampia, ma solo al momento della castrazione, mentre i campioni di sangue vengono raccolti da pochi suini, con la possibilità però di scandire temporalmente i prelievi. Una integrazione di questi dati potrebbe migliorare ulteriormente la comprensione della circolazione virale all'interno di un allevamento. Concludendo, gli EST sono un materiale utile per monitorare la circolazione di PRRSV e consentono una descrizione più accurata dell'epidemiologia del virus all'interno di un allevamento. Come già suggerito da altri lavori, un possibile scenario futuro potrebbe essere quello di elaborare dei sistemi di monitoraggio della PRRS con un uso integrato degli EST e dei campioni di sangue.

ABSTRACT

Use of processing fluids (PF) for PRRS virus monitoring in breeding herds is recently increased. Aim of this study was to asses a comparison between the PRRSV longitudinal monitoring based on blood samples and PF. The samples were collected in 10 farms with a 3-week routine during 5 months of study. PF were collect each batch with standard procedures in a pool of 10-15 litters to have a uniform size of the samples. From the same batch, 30 blood samples were collected,

before weaning. All the samples were submitted to PCR real time for PRRSV test. The presence of at least one positive sample per batch were sufficient to identify a positive status. Batches status based on the results from the two analysed materials were compared. Forty-five out of 64 batches showed the same PRRSV status. Conversely, 19 batches were discordant. Further data from three of the farms with a 1-week BMS (batch management system) confirmed the status and added more details at the PF monitoring dataset. A deeper analysis of these results disclose the truthfulness of both tests, PF express the status of 3-4 days old pigs, blood samples shows the batch status at pre-weaning age, with a relevant effect on viremia dynamic. Therefore, PF represent a wider population but only in one time point, while blood samples are collected from few pigs but even at different time points. An integrated interpretation of these data could lead a more deeply comprehension of the virus epidemiology within a herd. Finally, PF are a useful material for PRRS virus diagnosis and allow a more accurate description of the viremia dynamics within a farm. As already suggested by other studies, a possible future scenario could be the elaboration of PRRSV monitoring system with an integrate use of PF and blood samples.

INTRODUZIONE

L'impatto economico della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) sugli allevamenti italiani è molto rilevante ed il controllo del virus responsabile della patologia (PRRSV) continua ad essere uno stimolante campo di ricerca. Com'è noto la malattia ha forme cliniche diverse a seconda dell'età dei soggetti colpiti. Inoltre, la gravità della sintomatologia è influenzata da diversi fattori quali lo stato immunitario e la genetica dei suini, le condizioni ambientali, le infezioni secondarie e dal tipo di isolato virale (Jeffrey et al., 2012).

Le strategie di controllo della malattia si basano su un solido sistema di biosicurezza, sull'immunizzazione dei riproduttori e dei suinetti e sul controllo del flusso di animali. È quindi fondamentale conoscere il modello di circolazione virale all'interno dell'allevamento per poterlo classificare a seconda del livello di rischio. Tra i vari sistemi utilizzati, quello maggiormente condiviso è sicuramente quello proposto da Holtkamp e colleghi (Holtkamp et al., 2011). Tale metodo si basa sul livello di esposizione e di circolazione virale all'interno dell'allevamento, ponendo come punto focale la produzione di suini svezzati PRRSV-free.

Con questo obiettivo, la scelta del campionamento da effettuare sui suinetti in pre-svezzamento è un aspetto decisivo. Ad oggi il metodo più diffuso è quello del controllo periodico mediante PCR su siero ematico di un campione di 30 suinetti, target idoneo per rilevare almeno un positivo, assumendo almeno il 10% di prevalenza con un livello di confidenza del 95%, indipendentemente dalla dimensione della popolazione (Linhares et al., 2014). Ciononostante, alcuni studi hanno dimostrato che utilizzando questo approccio, esiste la possibilità di non rilevare alcuna positività anche in allevamenti endemicamente infetti (Linhares, 2013). È quindi sorta la necessità di affinare il metodo di campionamento e gli emosieri testicolari (EST) si stanno dimostrando una valida alternativa come materiale da sottoporre all'analisi biomolecolare. È stata rilevata un'alta concordanza tra i risultati delle PCR real-time ottenuti dall'analisi degli EST e quelli ottenuti dal siero ematico prelevati contestualmente (Lopez et al., 2018; Tonni et al., 2019). Inoltre è stata provata la validità come test di controllo in aziende infette che adottavano protocolli atti al raggiungimento dello status di "stabile" (Trevisan et al., 2019).

Lo scopo del presente lavoro è quello di confrontare l'utilizzo degli EST ed il siero ematico come materiale diagnostico per il monitoraggio della PRRS.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

In questo studio sono stati monitorati per la presenza di PRRSV 10 allevamenti da

riproduzione del Nord Italia per un periodo di circa 5 mesi. Sette allevamenti operavano secondo una routine tri-settimanale, tre allevamenti invece seguivano una scansione del lavoro settimanale. Nei primi sette allevamenti sono stati raccolti gli EST di tutte le nidiare raggruppandoli in pool di 10-15 nidiare (Tabella 1) e successivamente dalle stesse nidiare in fase di pre-svezzamento sono stati scelti 30 animali per il prelievo ematico.

I restanti tre allevamenti sono stati considerati come se lavorassero tri-settimanalmente, raccogliendo ogni tre settimane gli EST di tutte le nidiare, in pool di 10-15 nidiare. I medesimi animali sono stati poi campionati selezionando 30 soggetti in pre-svezzamento per il prelievo ematico. Dagli stessi tre allevamenti sono stati raccolti con uguali criteri anche gli EST delle nidiare relative alle due settimane che trascorrevano tra gli altri prelievi, senza però avere il prelievo di sangue in pre-svezzamento (Tabella 2).

Tabella 1. Numero di pool di EST raccolti per ogni azienda con bande tri-settimanali, lungo i 5 mesi di studio che sono valsi 6-7 bande campionate per azienda.

Table 1. Number of PF (processing fluids) collected per 3-weeks BMS (batch management system) farm during 5 months of study with 6-7 batches sampled each farm.

	N° scrofe presenti	Numero di pool di EST analizzati						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Azienda 1	210	2	3	3	3	3	3	2
Azienda 2	650	4	3	2	1	1	1	
Azienda 3	814	2	1	3	2	2	3	
Azienda 4	856	9	12	10	10	11	10	
Azienda 5	600	4	6	5	4	7	3	7
Azienda 6	500	1	3	1	3	3	3	
Azienda 7	251	4	4	1	4	4	4	

Tabella 2. Numero di pool di EST raccolti per ogni azienda con bande settimanali. Tra parentesi sono riportati i campioni di EST a cui non ha fatto seguito il prelievo di sangue in pre-svezzamento.

Table 2. Number of PF (processing fluids) collected per 1-weeks BMS (batch management system). In brackets, there are the PF of animals with no blood sampling in pre-weaning age.

	N° scrofe presenti	Numero di pool di EST analizzati													
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Azienda 8	828	2	(9)	2	(9)	2	(9)	3	(7)	4	(9)	2	(8)	2	
Azienda 9	1055	2	(9)	3	(11)	2	(8)	3	(8)	3	(4)	3	(9)	2	
Azienda 10	696	3	(8)	3	(6)	1	(9)	3	(8)	3	(9)	3			

Prelievo dei campioni e indagini di laboratorio

La raccolta del materiale derivante dalla castrazione chirurgica dei suinetti facenti parte di 10-15 bande è stata eseguita in modo tale da avere una ripartizione quantitativamente

omogenea tra i campioni durante ogni campionamento. La procedura seguiva quanto riportato da Vilalta e colleghi (2018) e dal materiale raccolto è stato prelavata una quantità di EST pari a 1,5 ml ed aliquotato in provette Eppendorf®. Tutti i campioni sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione (5 ± 3 °C) prima della analisi biomolecolare, eccezion fatta per gli EST le cui bande non prevedevano il prelievo ematico (aziende 8,9,10) che sono stati congelati a -20 ± 3 °C. I 30 soggetti per ogni banda da sottoporre a prelievo ematico sono invece stati scelti con un campionamento di convenienza scegliendo i suinetti maschi più deboli e meno reattivi (Lopez et al., 2018) con il preciso scopo di massimizzare la probabilità di individuare eventuali capi viremici. Anche il sangue è stato mantenuto a temperatura di refrigerazione (5 ± 3 °C) fino al momento della analisi, in questo caso eseguita in pool di 5 campioni come suggerito dalla letteratura (Lopez et al., 2018), procedura che garantisce pressoché la stessa sensibilità del test eseguito in singolo.

Gli EST ed il siero ematico (ottenuto dalla centrifugazione a 3000 rpm per 3' del sangue prelevato) hanno seguito successivamente le stesse procedure di laboratorio. L'estrazione dell'RNA è avvenuta mediante l'utilizzo del kit MagMax Core Nucleic Acid Purification (Applied Biosystem, Foster City, California) tramite estrazione automatica con Biosprint 96 instrument (Qiagen, Hilden, Germany), attenendosi alle istruzioni del produttore.

Su tutti i campioni la ricerca del virus della PRRS è stata eseguita grazie ad una RT-PCR Real-Time seguendo le istruzioni del kit Virotype PRRSV RT-PCR (Indical Bioscience, Leipzig, Germany). Il limite soglia per considerare una campione positivo è stato fissato ad un valore di Ct (cycle threshold) ≤ 37 .

Analisi statistica

Ad ogni campionamento, indipendentemente dal tipo di materiale raccolto, è stata sufficiente la presenza di almeno un campione positivo per considerarlo positivo, viceversa sono stati considerati negativi i campionamenti con tutte le PCR negative. In questo modo è stato possibile elaborare un parallelismo in cui confrontare lo status relativo alla PRRS di ogni azienda, per ogni banda in fase di svezzamento, sulla base dei risultati della PCR eseguita sugli EST oppure sul sangue.

Tutti i risultati della PCR sono stati poi inseriti in una tabella di contingenza con l'obiettivo di confrontare lo status di ogni banda sulla base dell'esito della PCR realizzata su un diverso materiale biologico (seppur prelevati in tempi diversi nel ciclo produttivo). Questi dati hanno quindi permesso un confronto grazie all'utilizzo dell'Indice di Concordanza e del valore della K di Cohen.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In tutti e dieci gli allevanti è stata rilevata circolazione virale durante il periodo di studio, con un valore medio di positività per quanto riguarda i campioni di EST pari a 32,07 ($\pm 2,67$) Ct e $2,24 \times 10^5$ copie virali ($\pm 5,58 \times 10^5$) mentre i campioni di sangue identificati come positivi hanno mostrato valori medi di Ct pari a 29,01 ($\pm 5,22$) con $2,25 \times 10^7$ ($\pm 8,41 \times 10^7$) copie virali. Il confronto tra lo status di ogni banda definito dagli esiti della PCR eseguita sugli EST e sul sangue mostra una corrispondenza non sempre perfetta (Figura 1), a fronte di 45 bande con status concorde ve ne sono 19 con attribuito un diverso status. Andando nel dettaglio della evoluzione cronologica di ogni allevamento ci sono quattro casi in cui lo status di positività viene rilevato più a lungo nel corso del tempo dall'analisi del sangue (allevamenti 1-2-4-7-9) rispetto a quello degli EST, mentre in tre casi (allevamenti 3-5-8) sono gli EST a rilevare una più persistente positività a fronte di campioni di sangue negativi. Le aziende con una routine settimanale (allevamenti 8-9-10), complete degli esiti delle PCR sugli EST di ogni settimana, mostrano come questi dati aggiuntivi portino una informazione più completa rispetto a quella

del solo prelievo ematico o dei soli EST raccolti ogni tre settimane, mostrando un numero maggiore di bande positive (Figura 2).

Il confronto tra lo status di ogni banda calcolato matematicamente ha stabilito una Concordezza del 69,0% e una k Cohen pari a 0,25.

	EST Sangue															
Banda 1				P	P	P	P		P		P	P				
Banda 2			P	P				P					P	P		
Banda 3	P	P			P	P	P	P					P			
Banda 4		P		P												
Banda 5					P			P			P	P				
Banda 6									P	P		P				
Banda 7											P					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						

Figura 1. Confronto tra lo status relativo alla PRRS basato sull'esito delle PCR eseguite sugli EST e sul sangue in pre-svezzamento. Per ognuno dei 10 allevamenti è stata evidenziata l'eventuale positività (P).

Figure 1. Herd classification for PRRS based on PCR results performed on PF or blood samples in pre-weaning age. Positive status for each farm was underlined (P).

	EST sangue	EST sangue	EST sangue			
Banda 1			P	P	P	P
Banda 2		P		P		
Banda 3	P				P	
Banda 4						
Banda 5	P				P	
Banda 6					P	
Banda 7	P					
	8	9	10			

Figura 2. Status relativo alla PRRS delle tre aziende con bande settimanali. L'esito delle PCR eseguite sugli EST raccolti nelle due bande non sottoposte al prelievo ematico in pre-svezzamento è stato accorpato in un unico valore (*).

Figure 2. Herd classification for PRRS of 1-weeks BMS farms. The results of PCR performed on PF relative of two batches with no pre-weaning blood sampling were merged in a single data (*).

I valori rilevati di Ct e copie genomiche sono stati di poco superiori nei campioni di sangue, rispetto a quelli di EST, dato già rilevato in letteratura (Vilalta et al., 2018), probabilmente dovuto all'effetto di diluizione che si ha negli EST.

Il dato ottenuto dalla analisi degli EST è frutto di un campionamento della popolazione più ampio rispetto la prelievo di sangue di 30 soggetti e ciò legittima una inferenza più attendibile (Vilalta et al., 2018). Inoltre l'utilizzo degli EST è stato provato con successo negli Stati Uniti come metodo di monitoraggio nel programma di eliminazione del virus in seguito a focolai di PRRS (Trevisan et al., 2019). Nel nostro studio, considerando singolarmente ogni banda e ponendo come test di riferimento quello effettuato sul sangue, l'analisi dei relativi EST sembra individuare alcune situazioni in cui l'utilizzo di questo materiale fornirebbe uno status falsamente negativo o falsamente positivo. In realtà il confronto viene fatto sullo stesso gruppo di animali ma in momenti diversi. La situazione a 3-4 giorni di vita (momento del prelievo degli EST) può essere diversa da ciò che si rileva 17-18 giorni dopo (prelievo ematico in pre-svezzamento) a seconda del momento in cui i soggetti si infettano. Infatti, i risultati di questo lavoro mostrano che lo studio della circolazione virale di un allevamento, basato esclusivamente sugli esiti forniti dagli EST ignora l'eventuale insorgenza di viremia successiva al momento della castrazione. È quindi normale che non ci sia una concordanza perfetta tra gli esiti dei due campionamenti perché mostrano la situazione in due momenti diversi, migliorando perciò la conoscenza della dinamica aziendale.

Un approccio coerente con quanto è stato rilevato, unito alla semplicità di esecuzione e all'affidabilità del metodo potrebbe essere quello di utilizzare gli EST come materiale diagnostico per un monitoraggio routinario in allevamenti endemicamente infetti. Tale procedura potrebbe incrementare la sensibilità del controllo se integrata secondo necessità, con un prelievo ematico in pre-svezzamento, così da massimizzare la possibilità di un successo diagnostico. In particolare, come suggerito da un recente lavoro (Trevisan et al., 2019), qualora si raggiungano almeno due campionamenti di EST con esito negativo si potrebbe procedere al successivo prelievo ematico in pre-svezzamento per confermare lo status di negatività.

CONCLUSIONI

L'utilizzo degli EST può essere incluso come materiale diagnostico nei sistemi di monitoraggio del virus della PRRS, in particolare può essere utile nella comprensione del modello di circolazione virale all'interno di ogni allevamento. Il vantaggio dell'impiego di questo materiale sta nella semplice procedura di raccolta unita alla possibilità di avere un dato rappresentativo di tutto l'allevamento che qualora descriva una situazione con assenza di circolazione virale deve essere integrato con il ben noto monitoraggio con prelievo di sangue su suinetti in pre-svezzamento. In conclusione, gli EST sono da considerare un valido materiale diagnostico in supporto al prelievo ematico sui suinetti per una più accurata definizione dello status di un allevamento relativo al virus della PRRS.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i colleghi Greta Tavella, Enrico Giacomini, Francesco Vantini e Giovanbattista Guadagnini per il prezioso contributo tecnico e per la collaborazione in campo, nonché tutti gli allevatori che hanno partecipato allo studio.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. 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.
3. Linhares, D. C., J. P. Cano, M. Torremorell, and R. B. Morrison, 2014, Comparison of time to PRRSV-stability and production losses between two exposure programs to control PRRSV in sow herds: *Prev Vet Med*, v. 116, p. 111-9.
4. Linhares, D. C. L., 2013, *Evaluation of Immune Management Strategies to Control and Eliminate Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)*, University of Minnesota, Saint Paul.
5. Lopez, W. A., J. Angulo, J. J. Zimmerman, and D. C. L. Linhares, 2018, Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids: *Journal of Swine Health and Production*, v. 26, p. 146-150.
6. Tonni, M., A. M. Maisano, M. B. Boniotti, F. Ostanello, G. Leotti, F. Scali, G. Santucci, S. Andreoni, and G. L. Alborali, 2019, Preliminary results of comparison between different diagnostic protocols for PRRSV monitoring in suckling piglets: *Proceeding of XLV annual meeting SIPAS*, p. 171-176.
7. Trevisan, G., E. Jablonski, J. Angulo, W. A. Lopez, and D. C. L. Linhares, 2019, Use of processing fluid samples for longitudinal monitoring of PRRS virus in herds undergoing virus elimination: *Porcine health Management*, v. 2019.
8. Vilalta, C., J. Sanhuezaa, J. Alvarezb, D. Murrayd, 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.