

SALIVA/FLUIDI ORALI VERSUS CAMPIONI DI SIERO: FATTIBILITÀ ED EFFICACIA DEL RILEVAMENTO DI ANTICORPI ANTI-SALMONELLA IN SUINI ALL'INGRASSO

SALIVA/ORAL FLUID VERSUS BLOOD SAMPLING: FEASIBILITY AND PERFORMANCE OF ANTI-SALMONELLA ANTIBODIES DETECTION IN FINISHING PIGS

DE LUCIA A.^{1,2}, CAWTHRAW S.², DAVIES R.², SMITH R.P.³, BIANCO C.⁴,
OSTANELLO F.¹, MARTELLI F.²

¹*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italy*

²*Animal and Plant Health Agency (APHA) Bacteriology Department, UK*

³*Animal and Plant Health Agency (APHA) Epidemiology Department, UK*

⁴*Animal and Plant Health Agency (APHA) Pathology Department, UK*

Parole chiave: Anticorpi anti-*Salmonella*, saliva, fluidi orali, siero, suini, ELISA

Keywords: *Salmonella* antibody, saliva, oral fluid, serum, pigs, ELISA

RIASSUNTO

Negli allevamenti suini, uno dei principali fattori limitanti l'impiego della sorveglianza sierologica è rappresentato dai costi di prelievo. I fluidi orali (OF) costituiscono una promettente alternativa all'utilizzo del siero di sangue come matrice da utilizzare per la diagnosi indiretta delle malattie infettive negli allevamenti intensivi. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'uso di campioni salivari raccolti da suini all'ingrasso per la ricerca di anticorpi anti-*Salmonella*. Venti campioni individuali appaiati di siero e saliva e 4 campioni di gruppo (OF) sono stati raccolti e analizzati con un kit commerciale ELISA per la ricerca di anticorpi IgG anti-*Salmonella*. Per valutare il possibile utilizzo di pool, sono stati inoltre esaminati pool artificialmente creati a partire da 5 campioni di siero e saliva raccolti in ciascuno dei box esaminati. Nonostante i livelli anticorpali più bassi rispetto ai rispettivi campioni sierici, modificando il protocollo del test ELISA è stato possibile rilevare anticorpi anti-*Salmonella* nei campioni di saliva e di OF. È stata evidenziata una correlazione positiva ($\rho=0,66$; $p<0,01$) con un valore di concordanza moderata ($K>0,62$; $p<0,01$) tra la concentrazione di IgG anti-*Salmonella* nei campioni individuali di siero e saliva. I campioni di OF rappresentano un pool di un numero più elevato di animali e sono risultati sempre positivi per anticorpi anti-*Salmonella*. I risultati di questo lavoro forniscono prove preliminari del fatto che i campioni di saliva possano rappresentare efficace alternativa ai campioni di sangue per la diagnosi di infezione da *Salmonella* negli allevamenti di suini.

ABSTRACT

Surveillance in pig herds is constrained mainly by the cost-effectiveness and efficiency of sampling methods. Saliva samples obtained by using absorptive devices, can provide an alternative diagnostic matrix to serum for monitoring disease status in pigs. The aim of this study was to investigate the correlation of anti-*Salmonella* antibodies between serum and saliva samples collected from pigs. Twenty individual paired serum and saliva samples and 4 collective samples (OF) were collected from a single farm. Pooled serum and saliva samples were created by pooling five individual samples from each pen. Anti-*Salmonella* IgG was detected in individual serum samples using a commercial

Salmonella ELISA kit, validated for sera. The same kit was used with a protocol modified by extending incubation time and increasing temperature to test individual saliva samples. *Salmonella* IgG in pig saliva were always detected at a lower level than in the matching serum samples. A correlation ($\rho=0.66$; $p<0.01$) and a moderate agreement ($K>0.62$; $p<0.01$) was found between individual *Salmonella* IgG in serum and saliva samples. Both correlation and the agreement levels are moderate. Pools of saliva gave positive/negative results by ELISA that corresponded to those of the appropriate serum pools. Pen-based OFs represent a pool of higher number of animals and were always positive. The results of this work provide some evidence that saliva samples have the potential to be used for the diagnosis of *Salmonella* infection in pig farms.

INTRODUZIONE

Nei paesi industrializzati *Salmonella spp* è il patogeno batterico più frequentemente isolato nei focolai epidemici di tossinfezione alimentare. L'epidemiologia della salmonellosi è un esempio convincente del paradigma *One Health* poiché per limitare l'incidenza dei casi umani occorre ridurre la prevalenza di *Salmonella* in allevamento e limitarne la dispersione nell'ambiente (Silva *et al.*, 2014).

Una parte significativa dei focolai umani è associata al consumo di carne suina contaminata (EFSA, 2018). Attualmente, però, la sorveglianza sierologica negli allevamenti di suini è limitata dai costi dei prelievi ematici e/o batteriologici e dai costi delle analisi di laboratorio (Ramirez *et al.*, 2012).

I campioni di fluido orale (*oral fluid* – OF) costituiscono una promettente alternativa all'utilizzo del siero di sangue come matrice da utilizzare per la diagnosi indiretta delle malattie infettive negli allevamenti suini (Decorte *et al.*, 2014; Fablet *et al.*, 2017; Prickett, 2009). L'OF è una miscela di secrezioni salivari e di trasudati mucosali; questi ultimi sono di derivazione ematica e contengono molti dei componenti presenti nel siero, inclusi gli anticorpi, e agenti patogeni che attraverso la mucosa possono essere trasferiti nella cavità orale e rilevati dall'esame dell'OF (Brandtzaeg, 2013; Taylor and Preshaw, 2016).

Nel suino, la raccolta dell'OF è facilmente realizzabile lasciando a disposizione degli animali una corda sospesa all'interno dei box che gli animali tenderanno a succhiare; l'OF verrà successivamente raccolto strizzando la corda. Dopo 30-60 minuti di esposizione all'interno di un box di 30 animali, circa il 75% dei suini avrà interagito con la corda. Se il numero di animali per box è superiore, è sufficiente aumentare il numero di corde, appendendole in aree diverse (White *et al.*, 2014). L'OF è quindi un campione collettivo molto rappresentativo degli animali presenti nel box. Inoltre, la procedura di raccolta dei campioni di OF è semplice, realizzabile anche da personale non sanitario ed economica (Prickett *et al.*, 2008). Considerando che la metodologia di raccolta dell'OF può variare, è importante utilizzare una terminologia standardizzata per descrivere accuratamente i campioni che ne risultano. In letteratura la saliva è definita come “il fluido ottenuto ... per espettorazione” mentre i fluidi orali come “il fluido ottenuto mediante l'inserimento di collettori assorbenti nella cavità buccale” (Atkinson *et al.*, 1993a). A seconda del metodo di raccolta o dell'utilizzo di stimolanti chimici per indurre il flusso salivare, i campioni ottenuti possono anche essere descritti come “stimolati o “non stimolati” (Olsen, 2012). I campioni raccolti mediante espettorazione o salivazione sono indicati come “non stimolati”, mentre i campioni ottenuti mediante l'utilizzo di materiali assorbenti sono di solito considerati “stimolati” (Atkinson *et al.*, 1993b; Olsen, 2012). Negli ultimi anni si è osservato un crescente interesse per l'utilizzo degli OF e numerosi studi hanno valutato il loro possibile utilizzo per la determinazione di immunoglobuline specifiche e/o agenti

patogeni di importanza per l'allevamento del suino (Prickett and Zimmerman, 2010). Tuttavia, per essere utilizzato come strumento di sorveglianza di routine, l'esame dei campioni di OF deve essere validato rispetto ai metodi standard di diagnosi.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di ottimizzare i criteri interpretativi dei risultati e valutare le performances in termini di sensibilità e specificità di un test immunoenzimatico (ELISA) commerciale, validato per la ricerca di anticorpi anti-*Salmonella* nel siero, su tamponi salivari e campioni di OF raccolti in un allevamento intensivo di suini. È stata quindi valutata la concordanza dei risultati ottenuti dall'esame sierologico dei campioni di saliva e di OF con i risultati ottenuti dell'esame del siero degli stessi soggetti, che ha rappresentato il *gold-standard*.

MATERIALI E METODI

Prelievo dei campioni

Lo studio è stato condotto in un'azienda a ciclo chiuso di circa 500 scrofe. L'anamnesi riportava la presenza di problemi sanitari causati da *Salmonella* Typhimurim, con sintomatologia clinica nei suini svezzati. Durante la visita in allevamento sono stati raccolti 4 campioni di OF mediante l'applicazione di una corda all'interno di 4 box scelti in maniera casuale (box A, B, C, D ciascuno contenente 20 suini Large White di circa 17 settimane di età e 60-70 kg di peso). Successivamente, da 5 animali per ciascun box sono stati prelevati campioni individuali appaiati di saliva e di sangue. Il prelievo di saliva è stato eseguito su animali in posizione di stazione quadrupedale, utilizzando tamponi Salivette® fissati su un'asta di plastica sterile e tenuti nella cavità orale dei suini fino a quando non erano completamente imbevuti. Per aumentare la quantità di saliva raccolta da ciascun animale, sono stati utilizzati due tamponi. Dopo la raccolta, i tamponi sono stati refrigerati a 4°C e inviati al laboratorio nella stessa giornata. Le provette contenenti i tamponi Salivette® sono state successivamente centrifugate in condizioni di refrigerazione a 3000 × g per 10 minuti e il surnatante è stato conservato a -80°C fino all'esecuzione dell'esame sierologico (Escribano *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2009). Per ogni animale, la saliva ricavata da ciascuno dei 2 tamponi è stata miscelata ed esaminata per la ricerca di anticorpi anti-*Salmonella*. Utilizzando un volume uguale di saliva per ciascun suino, sono stati creati 4 pool di saliva dei cinque animali campionati in ciascun box. In maniera analoga, sono stati creati 4 pool di siero.

Contestualmente al prelievo individuale di saliva, da ognuno dei 4 box si è proceduto alla raccolta dell'OF, utilizzando corde di cotone come descritto in bibliografia (Prickett *et al.*, 2008; White *et al.*, 2014). In ciascun box è stata posizionata una corda e lasciata a disposizione degli animali per circa 30 minuti. Allo scadere del tempo, la corda è stata posta all'interno di un sacchetto di plastica sterile e l'OF è stato raccolto per strizzamento. Successivamente, l'OF estratto è stato trasferito in una provetta da 50 ml. I campioni sono stati mantenuti refrigerati fino alla consegna in laboratorio, dove gli OF sono centrifugati a 1500 × g per 10 minuti e conservati a -80°C fino all'esecuzione dell'esame sierologico (Dawson, 2015).

I risultati di una precedente indagine batteriologica nell'azienda oggetto di questo studio riportavano, nei suini in svezzamento, una prevalenza di *Salmonella* del 60%. Di conseguenza, il numero di campioni esaminati per box (5 campioni di saliva e siero per box di 20 animali) è stato calcolato in modo da garantire il 95% di probabilità di evidenziare almeno 1 campione positivo quando la sieroprevalenza è $\geq 50\%$ (Miller *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2017). Come controlli negativi sono stati utilizzati cinque tamponi salivari e tre campioni di OF prelevati da scrofe *Salmonella*-free.

Rilevazione di anticorpi specifici per Salmonella mediante kit ELISA su campioni di saliva, OF e siero di sangue

La ricerca di anticorpi anti-*Salmonella* nei campioni di saliva, siero e OF, è stata condotta usando un kit commerciale ELISA indiretta (IDEXX Swine Salmonella Ab Test), validato per ricerca di IgG anti-*Salmonella* nel siero e nel *meat juice*.

I campioni di saliva e di siero sono stati esaminati prima singolarmente e, successivamente, in pool. I 4 pool di saliva e siero sono stati creati utilizzando volumi uguali di ogni matrice diagnostica prelevata da ciascuno dei cinque animali selezionati all'interno dei 4 box.

I campioni di siero individuali e in pool sono stati esaminati in duplicato, seguendo le istruzioni del produttore. Per i campioni individuali di saliva, i pool di saliva e l'OF, il protocollo di analisi suggerito dalla casa produttrice del kit ELISA è stato in parte modificato. Nello specifico, è stata utilizzata una diluizione 1:1 del campione; tale diluizione è risultata essere quella più efficace nel rilevare differenze tra gli animali, usando un volume minimo (50 µl) di campioni di saliva, pool di saliva e OF. I campioni, esaminati in duplicato, sono stati successivamente incubati ad una temperatura superiore (37°C) e per un periodo di tempo maggiore (2 ore) rispetto a quanto indicato dal produttore. Le fasi successive all'incubazione sono state realizzate secondo le indicazioni del produttore del kit ELISA.

I cinque campioni negativi di saliva e i tre campioni di OF raccolti da suini *Salmonella*-free sono stati rispettivamente aggregati in pool e inclusi in ciascuna piastra come controlli negativi. Il rapporto S/P è stato calcolato utilizzando i valori di lettura del siero di controllo negativo fornito con il kit ELISA.

Analisi statistica

Per valutare la correlazione tra i valori ELISA S/P ottenuti dall'esame dei campioni individuali di saliva e siero è stato calcolato il coefficiente di correlazione non parametro *rho* di Spearman. La concordanza tra i risultati (positivo/negativo) dei campioni individuali di saliva e siero raccolti dagli stessi animali è stata valutata utilizzando il coefficiente Kappa di Cohen (*K*). I valori di cut-off ottimali per l'interpretazione dei valori S/P ottenuti dall'analisi dei campioni di saliva e OF sono stati determinati attraverso la curva ROC. È stata inoltre calcolata la sensibilità (*Se*) e la specificità (*Sp*) relativa del test ELISA eseguito su saliva e OF rispetto al *gold standard* rappresentati dall'esame ELISA dei sieri. Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato utilizzato per verificare la normalità della distribuzione dei dati e, sulla base dei risultati di questo test, sono stati utilizzati il test U di Mann-Whitney e il test H di Kruskal-Wallis per confrontare i valori S/P dei campioni di siero e saliva rispettivamente a livello di box e di popolazione campionata. L'analisi dei dati è stata realizzata utilizzando il software SPSS 23.0 (IBM SPSS Statistics, NY, USA). La significatività statistica è stata fissata ad un valore di $p < 0,05$.

RISULTATI

La raccolta della saliva individuale mediante l'utilizzo di due tamponi ha permesso di ottenere circa di 467 ± 102 µl (media \pm SEM) di saliva per ciascun animale. La raccolta dell'OF mediante le corde ha invece consentito di raccogliere un volume maggiore (3-8 ml), più che sufficiente per eseguire diverse determinazioni analitiche.

In tabella 1 vengono riportati i risultati della valutazione, mediante test ELISA commerciale, della quantità di IgG anti-*Salmonella* rilevata nei campioni di siero, saliva e OF. In generale, i valori S/P ottenuti dall'esame dei campioni individuali di saliva sono significativamente inferiori rispetto ai valori S/P dei sieri corrispondenti ($U=0,00$; $p < 0,001$) (Tabella 1 e Figura 1).

Analogamente, considerando ciascuno dei 4 box, i valori S/P dei sieri individuali sono risultati essere sempre superiori rispetto ai valori S/P dei corrispondenti campioni di saliva ($U=0,00$ $p=0,03$; $U=0,00$ $p=0,01$; $U=0,00$ $p=0,01$; $U=0,00$ $p=0,01$ rispettivamente nei box A, B, C, D). Nessuna differenza significativa è stata invece evidenziata per i valori S/P dei sieri e i valori S/P dei campioni di saliva tra i 4 box (rispettivamente: $H=5,94$ $p=0,12$ e $H=2,87$; $p=0,41$).

L'analisi statistica ha permesso di stabilire una correlazione positiva tra i valori S/P degli anticorpi anti *Salmonella* rilevati nei sieri e nei campioni individuali di saliva ($\rho=0,66$; $p=0,002$) (Figura 1).

L'analisi della curva ROC ha evidenziato che la migliore correlazione (Area sotto la curva, AUC: 90,0%) tra i risultati ELISA ottenuti dall'esame della saliva e del siero si ottiene con un valore di S/P dei campioni di saliva $\geq 0,03$. Utilizzando come valore di cut-off $S/P \geq 0,03$, l'esame dei campioni di saliva ha una Se dell'86% (95%CL: 57-98) e una Sp dell'80% (95%CL: 28-99), rispetto ai risultati ELISA ottenuti esaminando i campioni di siero (Tabella 2).

Il calcolo del coefficiente Kappa di Cohen ha evidenziato una concordanza moderata ($K > 0,62$; $p = 0,002$) tra le due matrici esaminate: il *gold standard*, rappresentato dal siero (considerato positivo per valori $S/P > 1,00$) e i campioni di saliva (considerati positivi per valori $S/P > 0,03$). Solo due dei suini positivi all'esame del siero sono risultati negativi all'esame dei campioni di saliva.

In 3 dei 4 box esaminati, quando i campioni individuali di saliva o siero degli animali selezionati da ciascun box sono stati miscelati tra loro, si è ottenuto un risultato positivo all'esame dei pool anche quando nel campione collettivo erano presenti campioni individuali negativi di siero o saliva (box B, C e D) (Tabella 1).

Per quanto riguarda il box A, a causa della scarsità del materiale raccolto, è stato possibile creare i pool di siero e saliva miscelando solo due campioni (dei 5 raccolti), di cui uno positivo e uno negativo al test ELISA. L'esame dei pool di saliva e siero ottenuti ha fornito, entrambi i casi, un esito negativo.

In 3 dei 4 box esaminati, oltre il 50% dei campioni individuali di siero era positivo e anche i rispettivi campioni di OF sono risultati positivi al test ELISA. Nel box D, nonostante solo 2 dei 5 campioni individuali di siero siano risultati positivi al test ELISA, il corrispondente campione di OF è risultato positivo.

DISCUSSIONE

Questo lavoro ha evidenziato la possibilità di ottimizzazione un test commerciale ELISA, messo a punto per l'esame del siero, per la ricerca di anticorpi anti *Salmonella* su matrici alternative al sangue.

Modificando il protocollo di esecuzione del test commerciale IDEXX ELISA, è stato possibile rilevare la presenza di anticorpi anti-*Salmonella* nei campioni di saliva e di OF raccolti da suini all'ingrasso di un allevamento intensivo. Il protocollo di esecuzione del kit ELISA è stato parzialmente modificato, partendo dal presupposto che la concentrazione di anticorpi nei campioni di saliva e di OF sia inferiore rispetto a quella presente nel siero. Nello specifico, è stata utilizzata una diluzione inferiore del campione e modificati i tempi e le temperature di incubazione per favorire il legame tra gli anticorpi anti-*Salmonella* potenzialmente presenti nei campioni di saliva e OF e l'antigene che riveste la piastra ELISA. Tali modifiche hanno consentito di ottenere dei valori di Se e Sp diagnostica dell'esame delle matrici alternative al sangue (saliva e OF), rispettivamente del 86% e 80% rispetto al *gold standard* rappresentato dall'esame del siero ematico (Tabella 2).

Tabella 1: IgG anti-*Salmonella* rilevate nei campioni di siero e saliva (individuali e pool) e nei campioni di gruppo (OF). I valori di cut-off di S/P >1 e S/P>0,03 sono stati utilizzati rispettivamente per siero e saliva/OF per discriminare gli animali positivi da quelli negativi. I pool di siero e saliva del box A sono stati allestiti utilizzando solo i campioni individuali degli animali 3 e 4.

Table 1: Anti-*Salmonella* ELISA IgG OD values of individual and pool samples of serum and saliva and pen-based OF. Positive samples are chosen in accordance with the S/P >1 for the serum and S/P>0.03 for saliva and OF samples. Serum and saliva pools of pen A were prepared by pooling only samples from animal 3 and animal 4.

Box	Suino n.	Campioni individuali di siero			Campioni individuali di saliva			Pool di siero			Pool di saliva			Campioni di OF		
		OD	S/P ratio	pos/neg	OD	S/P ratio	pos/neg	OD	S/P ratio	pos/neg	OD	S/P ratio	pos/neg	OD	S/P ratio	pos/neg
A	1	3,23	2,95	pos	0,27	0,20	pos									
A	2	1,25	1,17	pos	0,76	0,71	pos	0,79	0,67	neg	0,09		neg	0,35		pos
A	3	1,15	1,05	pos	0,29	0,22	pos									
A	4	0,78	0,91	neg	0,08	0,02	neg									
B	6	2,82	2,85	pos	0,10	0,04	neg									
B	7	2,75	2,77	pos	0,22	0,15	pos									
B	8	3,39	3,46	pos	0,30	0,23	pos	2,63	2,45	pos	0,32		pos	0,54		pos
B	9	1,26	1,18	pos	0,15	0,07	pos									
B	10	3,20	2,93	pos	0,73	0,63	pos									
C	11	0,98	0,87	neg	0,07	0,00	neg									
C	12	1,39	1,32	pos	0,34	0,27	pos									
C	13	3,32	3,38	pos	0,83	0,73	pos	2,19	2,03	pos	0,33		pos	0,35		pos
C	14	1,59	1,53	pos	0,23	0,16	pos									
C	15	1,11	1,02	pos	0,06	0,00	neg									
D	16	0,87	0,76	neg	0,09	0,03	neg									
D	17	0,96	0,86	neg	0,08	0,00	neg									
D	18	1,00	0,90	neg	0,09	0,01	neg	1,37	1,23	pos	0,28		pos	0,38		pos
D	19	1,25	1,26	pos	0,05	0,00	neg									
D	20	2,36	2,35	pos	0,46	0,38	pos									

È stata evidenziata una correlazione positiva tra i valori S/P dei campioni di siero e dei corrispondenti campioni individuali di saliva. Ciò indica che i campioni individuali di saliva possono rappresentare una valida alternativa ai campioni di sangue per la rilevazione di anticorpi anti-*Salmonella*.

In accordo con quanto già noto (Olsen *et al.*, 2013), i livelli di IgG anti-*Salmonella* rilevati nei sieri dei suini esaminati sono risultati essere sempre superiori rispetto ai livelli anticorpali riscontrati nei rispettivi campioni di saliva ($p>0,05$). Analogamente a quanto si verifica quando si comparano i risultati dell'esame di campioni di sangue e di *meat juice* ottenuti dagli stessi animali (Wallander *et al.*, 2015), i suini i cui sieri presentavano valori S/P di poco superiori al valore di cut-off del kit ELISA potrebbero avere quantità di IgG nella saliva al di sotto del limite di rilevanza del test.

Nel corso di questo studio, due suini sono risultati positivi all'esame del siero ma negativi all'esame dei campioni di saliva. Ciò può essere imputato alla bassa positività riscontrata nei due sieri, per i quali sono stati rilevati valori di S/P di poco superiori al valore di cut-off del kit ELISA.

L'utilizzo dei pool è interessante poiché permette di esaminare più individui contemporaneamente con un costo unitario inferiore e, allo stesso tempo, di accertare la presenza della malattia all'interno del gruppo (box). Tuttavia, nell'utilizzo dei pool è importante che le prestazioni analitiche dei kit utilizzati rimangano elevate. Dei quattro pool di sieri o di saliva analizzati in questo studio, tre hanno dato esito positivo al test ELISA (box B, C e D), anche quando i pool erano composti dall'aggregazione di campioni individuali positivi e negativi. Al contrario, è probabile che per il box A l'effetto di diluizione derivante dall'utilizzo dei pool abbia causato una perdita di sensibilità, portando a un risultato negativo al test ELISA. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che, per questo box, solo due dei cinque campioni prelevati hanno contribuito alla costituzione del pool esaminato.

Figura 1: Correlazione tra i valori S/P di IgG anti-*Salmonella* ottenuti dall'esame mediante test ELISA di campioni individuali di siero e saliva raccolti da suini all'ingrasso.

Figure 1: Correlation between anti-Salmonella ELISA IgG S/P ratio values of individual serum and matching S/P ratio saliva samples collected from finisher pigs.

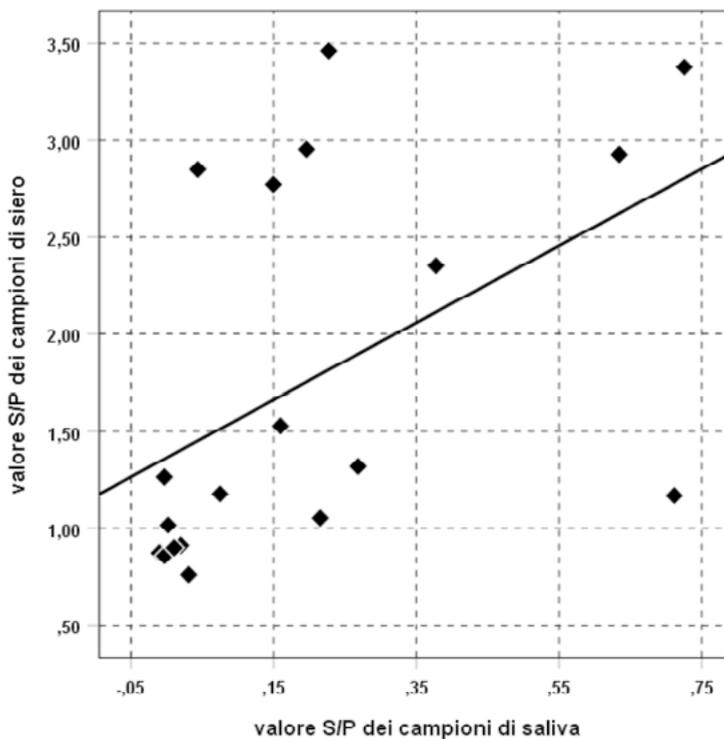


Tabella 2: Campioni di siero e saliva positivi e negativi per anticorpi IgG anti-Salmonella. Il coefficiente kappa di Cohen indica un accordo sostanziale tra i risultati (K=0,62).

Table 2: Number of porcine serum and saliva samples positive and negative for anti-Salmonella IgG antibodies. Cohen's kappa coefficient showed a substantial agreement (K=0.62).

		Presenza di anticorpi anti-Salmonella nella saliva (%)		
		positivo	negativo	totale
Presenza di anticorpi anti-Salmonella nel siero (%)	Positivo	12 (85,7)	2 (14,3)	14
	Negativo	1 (20,0)	4 (80,0)	5
	Totale	11 (57,9)	8 (42,1)	19
		Se: 86% (95% CL: 57-98)	Sp: 80% (95% CL: 28-99)	K: 0,62

La possibilità che la miscelazione di campioni individuali positivi con campioni negativi porti la concentrazione degli analiti (es. anticorpi) al di sotto della soglia di rilevabilità della metodica diagnostica (causando così una falsa negatività), è il principale limite all'uso dei pool come matrice diagnostica. La possibilità che gli anticorpi target vengano "diluisti" al di sotto del valore di cut-off del metodo, dipende dalle concentrazioni relative degli stessi analiti presenti in ciascun campione individuale. È dunque necessario utilizzare test diagnostici con un'alta sensibilità analitica per consentire l'utilizzo dei pool come procedura di screening dello stato sanitario ed epidemiologico della popolazione (Arnold *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2003; De Lucia *et al.*, 2019).

La raccolta dei fluidi orali (OF) mediante l'impiego di corde assorbenti rappresenta un'altra modalità per ridurre i costi di prelievo e di analisi. Infatti, l'OF raccolto da una singola corda è un campione rappresentativo dei 30 animali presenti nel box. I campioni di OF raccolti nei box con una elevata prevalenza individuale di sieri positivi alla ricerca di anticorpi anti-Salmonella (≥ 50) sono risultati positivi al test ELISA (Tabella 1) (Miller *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2017). Gli OF sono risultati positivi per anticorpi anti-Salmonella anche quando la maggior parte dei campioni individuali di siero erano negativi (box D). Ciò è presumibilmente dovuto agli alti livelli di anticorpi specifici presenti nei campioni individuali positivi.

I risultati di questo studio preliminare indicano che i campioni collettivi (es. OF) possono rappresentare una utile matrice biologica da utilizzare per lo screening di *Salmonella* in allevamento. Tuttavia sono necessarie ulteriori ricerche per confermare questi risultati preliminari. In particolare, per l'efficace utilizzo dei campioni di gruppo come strumento di monitoraggio delle malattie infettive nell'allevamento del suino, è necessaria una maggiore comprensione delle performances diagnostiche (specificità e sensibilità) dei test utilizzati per l'esame di pool e il possibile effetto diluizione ad esso correlato.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Department for Environment, Food and Rural Affairs (UK) e IDT Biologika per avere supportato questo studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Arnold M., Mueller-Doblies D., Carrique-Mas J., Davies R. (2009). The estimation of pooled-sample sensitivity for detection of *Salmonella* in turkey flocks. *Journal of applied microbiology* 107, 936-943.
2. Arnold M.E., Cook A., Davies R. (2005). A modelling approach to estimate the sensitivity of pooled faecal samples for isolation of *Salmonella* in pigs. *Journal of the Royal Society Interface* 2, 365-372.

3. Atkinson J., Dawes C., Ericson T., Fox P., Gandara B., Malamud D., Mandel I., Navazesh M., Tabak L. (1993a). Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 694.
4. Atkinson J., Dawes C., Ericson T., Fox P., Gandara B., Malamud D., Mandel I., Navazesh M., Tabak L. (1993b). Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 694.
5. Brandtzaeg P. (2013). Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *Journal of oral microbiology* 5, 20401.
6. Davies R., Heath P., Coxon S., Sayers A. (2003). Evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for *Salmonella*. *Journal of applied microbiology* 95, 1016-1025.
7. Dawson L.L. (2015). Oral fluid as a non-invasive alternative diagnostic medium for disease monitoring in pigs. Newcastle University,
8. De Lucia A., Rambaldi M., Ostanello F. (2019). Oral fluids, meat juice, and processing fluids: non-invasive alternative diagnostic medium for disease monitoring in pigs. *Large Animal Review* 25, 25-33.
9. 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. *BMC Vet Res* 10, 134.
10. EFSA (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSa Journal* 16, e05500.
11. Escribano D., Gutiérrez A., Subiela S.M., Tecles F., Cerón J. (2012). Validation of three commercially available immunoassays for quantification of IgA, IgG, and IgM in porcine saliva samples. *Research in veterinary science* 93, 682-687.
12. Fablet C., Renson P., Pol F., Dorenlor V., Mahé S., Eono F., Eveno E., Le Dimna M., Liegard-Vanhecke D., Eudier S., (2017). Oral fluid versus blood sampling in group-housed sows and finishing pigs: feasibility and performance of antibody detection for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary microbiology* 204, 25-34.
13. Gutiérrez A., Martínez-Subiela S., Eckersall P., Cerón J. (2009). C-reactive protein quantification in porcine saliva: a minimally invasive test for pig health monitoring. *The Veterinary Journal* 181, 261-265.
14. Miller A., Twomey D., Davies R., Teale C., Williamson S., Reichel R., Featherstone C., Cook A., Snow L., Armstrong J. (2011). *Salmonella* serovars and antimicrobial resistance patterns on a sample of high seroprevalence pig farms in England and Wales (2003–2008). *Zoonoses and public health* 58, 549-559.
15. Olsen C., Karriker L., Wang C., Binjawadagi B., Renukaradhya G., Kittawornrat A., Lizano S., Coetzee J., Main R., Meiszberg A., (2013). Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *The Veterinary Journal* 198, 158-163.
16. Olsen C.W. (2012). Sampling considerations pertinent to the detection of analytes in swine oral fluids. Iowa State University.
17. Prickett J., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K.-J., Evans R.B., Zimmerman J.J. (2008). Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 156-163.
18. Prickett J.R. (2009). Detection of viral pathogens of swine using oral fluid specimens. Iowa State University.
19. Prickett J.R., Zimmerman J.J. (2010). The development of oral fluid-based diagnostics

- and applications in veterinary medicine. *Animal Health Research Reviews* 11, 207-216.
20. Ramirez A., Wang C., Prickett J.R., Pogranichniy R., Yoon K.J., Main R., Johnson J.K., Rademacher C., Hoogland M., Hoffmann P., Kurtz A., Kurtz E., Zimmerman J. (2012). Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Preventive veterinary medicine* 104, 292-300.
 21. Silva C., Calva E., Maloy S. (2014). One health and food-borne disease: Salmonella transmission between humans, animals, and plants. *One Health: People, Animals, and the Environment*, 137-148.
 22. Smith R.P., Andres V., Dormer L., Gosling R., Oastler C., Davies R.H. (2017). Study of the impact on Salmonella of moving outdoor pigs to fresh land. *Epidemiology & Infection* 145, 1983-1992.
 23. Taylor J.J., Preshaw P.M. (2016). Gingival crevicular fluid and saliva. *Periodontology* 2000 70, 7-10.
 24. Wallander C., Frössling J., Vågsholm I., Burrells A., Lundén A. (2015). “Meat juice” is not a homogeneous serological matrix. *Foodborne pathogens and disease* 12, 280-288.
 25. White D., Rotolo M., Olsen C., Wang C., Prickett J., Kittawornrat A., Panyasing Y., Main R., Rademacher C., Hoogland M. (2014). Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *Journal of Swine Health and Production* 22, 138-141.