

## MONITORAGGIO DEI PRRSV E SIV IN SUINI SVEZZATI MEDIANTE L'USO DI FLUIDI ORALI

GIACOMINI E.<sup>[1]</sup>, LAZZARO M.<sup>[1]</sup>, BONIOTTI M.B.<sup>[1]</sup>, SCALI F.<sup>[1]</sup>, PASQUALI P.<sup>[2]</sup>,  
AMADORI M.<sup>[1]</sup>, RUGGERI J.<sup>[1]</sup>, BARDINI R.<sup>[3]</sup>, GAMBA F.<sup>[4]</sup>, LEOTTI G.<sup>[5]</sup>,  
ANA M.<sup>[1]</sup>, ALBORALI G.L.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia Emilia Romagna ~ Brescia ~ Italy,

<sup>[2]</sup>Istituto Superiore Sanità ~ Roma ~ Italy, <sup>[3]</sup>Trow Nutrition Italia SpA ~ Verona ~ Italy, <sup>[4]</sup>  
Libero Professionista ~ Mantova ~ Italy, <sup>[5]</sup>Meril Italia SpA ~ Milano ~ Italy

Keywords: SIV, PRRSV, Oral fluid

### Riassunto

Le patologie respiratorie nell'allevamento suino sono la principale causa di perdite economiche. Di conseguenza, negli anni si sono sviluppate pratiche di management e di profilassi per il loro controllo. Questo studio è stato svolto in 8 allevamenti, facendo dei prelievi in suini allo svezzamento di età compresa fra 30-90 giorni. E' stato prelevato il sangue venoso da ogni soggetto, assieme a tamponi nasali (TN), poi analizzati in pool da 5 animali l'uno, e la saliva (OF). Le matrici sono state analizzate per la ricerca di virus Porcine Reproductive Respiratory Syndrome (PRRSV) e Virus Influenzale Suino (SIV) tramite real-time RT-PCR. I risultati per PRRSV sul siero di sangue mostrano una maggiore prevalenza di campioni positivi con l'avanzare dell'età, con valori più che raddoppiati da 30 a 90 giorni di vita sia per PRRSV che per SIV. La percentuale di concordanza in RT-PCR fra siero e OF è stata pari a 83% mentre quella fra TN e OF era del 92%.

### Abstract

Respiratory diseases represent causes of major economic losses in pig production. Therefore, management approaches and prophylaxis plans have been developed for their control and treatments. This study was conducted in 8 farms by sampling 1-3 months old pigs. Blood samples and nasal swabs (NS) were taken from a total of 45 animals and examined as pool of 5 animals. In addition, 3 oral fluids (OF) at each time point were taken. The three types of sample were examined for Porcine Reproductive Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) and Swine Influenza Virus (SIV) by real-time RT-PCR. The results of PRRSV test on blood serum indicated an increasing of prevalence related to age, being the values for both PRRSV and SIV more than doubled between 30 and 90 dd of age. The agreement with RT-PCR for PRRSV between serum and OF was 83% and that between TN and OF was 92%.

### INTRODUZIONE:

Il controllo e la gestione delle principali patologie respiratorie nell'allevamento suino, quali la Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino (PRRS - porcine reproductive respiratory disease) e Influenza (SI - swine influenza) sono di fondamentale importanza nell'ottica dell'impatto economico che queste malattie possono avere in azienda. Basti pensare che la sola infezione da PRRSV negli Stati Uniti provoca un costo annuo stimato di 664 milioni di dollari (6). L'intervento immunizzante può essere d'aiuto nel controllo di SIV anche se l'efficacia di questa strategia è talvolta inficiata dalla estrema varietà di ceppi circolanti (11). Clinicamente SIV si manifesta con febbre, anoressia, letargia, tosse secca, starnuti e spesso ritardo della crescita (3, 8). Nella prospettiva del controllo delle patologie respiratorie del suino va considerata la non rara la co-infezione con altri agenti batterici o virali tra cui lo stesso PRRSV (2), che provoca un aumento della gravità

della malattia (4). L'assenza di PRRSV circolante in suinetti allo svezzamento può essere un indicatore della corretta gestione e controllo della patologia (7). Anche una precisa e rapida diagnosi di queste patologie assume un importante ruolo ai fini del controllo della circolazione virale e sono pertanto necessari metodi semplici, rapidi e non invasivi. I tamponi nasali per la ricerca di SIV sia nell'uomo che nel suino sono da considerarsi i materiali di riferimento (5). Tuttavia, l'uso di matrici comuni come il sangue o tamponi nasali può essere sostituito o talvolta integrato con il prelievo di liquidi orali. L'uso della saliva come matrice diagnostica è una metodica consolidata in campo umano (10). Nel settore zootecnico il prelievo di liquidi orali nel suino è stato messo a punto in condizioni di campo nel 2008 e rappresenta oggi un'alternativa per la diagnosi e la ricerca di PRRSV (9) e SIV (5). Si tratta di una pratica di facile esecuzione, che riduce notevolmente i costi e l'impegno logistico ed organizzativo connesso all'esecuzione dei prelievi di sangue (1). I liquidi orali vengono raccolti tramite corde di cotone lasciate masticare ai suini e poi spremute. Lo scopo del nostro studio è stato capire la circolazione di PRRSV e SIV nella fase di svezzamento e analizzare la sensibilità delle diverse matrici per la rilevazione di questi virus.

### **MATERIALI E METODI:**

Questo studio è stato condotto in 7 allevamenti con riproduttori, 5 a ciclo aperto, 2 a ciclo chiuso e un'azienda di svezzamento situati tutti in un'area ad alta densità suinicola. In 5 allevamenti si pratica la vaccinazione PRRSV nelle scrofe usando un vaccino vivo attenuato mentre in una sola azienda viene attuata la profilassi nei confronti di SIV. Il protocollo di campionamento ha coinvolto 45 suini scelti in forma random in 9 box (5 per box) divisi in 3 fasce d'età distanziate di un mese (15 per fascia) partendo da animali di 30 gg di vita fino a suini di 90 gg di vita (T0, T1, T2). In ogni classe d'età sono stati eseguiti 15 prelievi di sangue, 15 tamponi nasali (TN) e 3 campioni di liquidi orali (OF). Per ogni azienda sono stati raccolti un totale di 45 campioni di sangue, 45 TN e 9 OF ed analizzati 9 pool di sangue, 9 TN e 9 OF. I campioni di sangue sono stati analizzati a pool da 5 (3 pool per classe d'età) per la ricerca di PRRSV tramite RT-PCR, i tamponi nasali (TN) sono stati analizzati a pool da 5 (3 pool) per la ricerca di SIV tramite RT-PCR; i campioni di OF sono stati ottenuti tramite l'applicazione di una corda in ciascun box che è stata lasciata masticare per 30 minuti; la corda è stata in seguito strizzata per raccogliere il liquido orale in sacchetto stomacher. I campioni così ottenuti sono stati analizzati tramite RT-PCR verso entrambi i virus, I campioni prelevati sono stati trasportati mantenendo la catena del freddo alla sezione diagnostica IZSLER di Brescia. Per i campioni risultati positivi a SIV si è proceduto inoltre alla tipizzazione del ceppo con PCR multiplex.

### **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

#### **PRRSv**

Sette degli 8 allevamenti considerati sono risultati essere positivi in PCR a PRRSV. Prendendo in considerazione gli 8 allevamenti, i pool di campioni di sangue risultati positivi sono stati 4/24 al T0, 10/24 al T1 e 10/24 al T2, mentre gli allevamenti dove almeno un pool di sieri è risultato positivo sono stati 2, 5 e 5 rispettivamente per il T0, T1 e T2. I campioni di OF risultati positivi 5/24 sono stati al T0, 8/24 al T1 e 15/24 al T2, mentre gli allevamenti dove almeno un campione OF è risultato positivo sono stati 3, 4 e 5 rispettivamente per il T0, T1 e T2 (Tabella 1). La percentuale di concordanza in RT-PCR fra siero e OF è stata pari a 83%. SIV Sei degli 8 allevamenti considerati sono risultati positivi in RT-PCR a SIV. I pool di tamponi nasali risultati positivi sono stati 2 /24 al T0, 7 / 24 al T1 e 9 /24 al T2, mentre gli allevamenti dove almeno uno di tali pool è risultato positivo sono stati 1, 4 e 4 rispettivamente per il T0, T1 e T2. I campioni di OF risultati positivi sono stati 3/24 al T0, 5/24 al T1 e 7/24 al T2, mentre gli allevamenti dove almeno un campione è risultato positivo sono stati 2, 3 e 4 rispettivamente per il T0, T1 e T2 (Tabella 2). La percentuale di concordanza fra TN e OF in RT-PCR è stata pari a 92%. La tipizzazione dei tamponi nasali ri-

sultati positivi a SIV ha rivelato che in 3 aziende il ceppo circolante era H1N2 e in una sola H1N1. In tre allevamenti non si è potuto isolare il virus. Nessun campione è risultato positivo in RT-PCR nei confronti di H1N1 ceppo pandemico (Tabella 3).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo studio preliminare è stato confrontare le diverse matrici e valutare la loro idoneità per l'isolamento di PRRSV e SIV. L'elevata percentuale di concordanza ottenuta tra siero e OF per PRRSV (83 %) e fra TN e OF per SIV (92%) conferma che gli OF rappresentano una reale alternativa alle matrici tradizionali per il monitoraggio di PRRSV e SIV negli svezzamenti. Il rispetto di un protocollo di campionamento standardizzato, la tempestività di invio e il mantenimento della catena del freddo durante il trasporto al laboratorio sono requisiti fondamentali per mettere in evidenza la circolazione di questi virus in gruppi di suini con diverse età presenti nello stesso svezzamento. Il confronto dei risultati ottenuti evidenzia che gli OF possono essere utilizzati per il monitoraggio di aziende da svezzamento con elevata e bassa circolazione virale. Dalle analisi eseguite si evince che per entrambe le patologie ed entrambe le matrici c'è una positività crescente con il progredire dell'età di campionamento. Nell'azienda "sito 2" non sono state evidenziate positività per PRRSV e SIV, suggerendo che l'utilizzo OF può essere allargata anche ad allevamenti negativi e ad aziende multisito con elevati standard sanitari.

		PRRS					
		sangue			OF		
AZIENDA	TIPOLOGIA	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	CA	0	0	1	0	0	3
2	CA	0	2	3	0	2	3
3	CA	0	1	0	1	2	3
4	CA	0	0	2	0	0	3
5	CA	1	2	2	1	2	0
6	CC	3	2	0	3	0	0
7	CC	0	3	2	0	2	3
8	SITO 2	0	0	0	0	0	0

Tabella 1. Risultati delle analisi per PRRSV in RT-PCR da sangue e saliva

		SIV					
		TN			OF		
AZIENDA	TIPOLOGIA	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	CA	0	0	0	1	0	0
2	CA	0	3	3	0	3	3
3	CA	2	1	1	2	1	1
4	CA	0	0	3	0	0	1
5	CA	0	1	2	0	0	2
6	CC	0	0	0	0	0	0
7	CC	0	2	0	0	1	0
8	SITO 2	0	0	0	0	0	0

Tabella 2. Risultati delle analisi per SIV in RT-PCR da sangue e saliva

AZIENDA	TIPOLOGIA	TIPIZZAZIONE
1	SITO 1	H1N2
2	CA	H1N2
3	CA	H1N2
4	CA	NON ISOLATO
5	CA	NON ISOLATO
6	CC	NON ISOLATO
7	CC	H1N1
8	SITO 2	0

Tabella 3. Esiti della tipizzazione dei ceppi influenzali SIV

### BIBLIOGRAFIA:

1. Bilato D., Drigo M., Pasotto D. and Amadori M., 2014. Analisi comparativa di parametri immunologici sierici, mucosali e cellulo-mediati dopo infezione di campo da virus PRRS (PRRSV) Atti Della Società Italiana Di Patologia Ed Allevamento Dei Suini Meeting Annuale Vol. XL; pag. 205-209.
2. Choi Y.K., Goyal S.M. and Joo H.S., 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne. Vol. 44 (issue 9); pag. 735-737.
3. Decorte I., Steensels M., Lambrecht B., Cay A.B. and De Regge N., 2015. Detection and Isolation of Swine Influenza A Virus in Spiked Oral Fluid and Samples from Individually Housed, Experimentally Infected Pigs: Potential Role of Porcine Oral Fluid in Active Influenza A Virus Surveillance in Swine. Plos One. Vol. 10 (issue 10).
4. Dobrescu I., Levast B., Lai K., Delgado-Ortega M., Walker S., Banman S., Townsend H., Simon G., Zhou Y., Gerdtts V. and Meurens F., 2014. In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. Veterinary Microbiology. Vol. 169 (issue 1-2); pag. 18-32.
5. Goodell C.K., Prickett J., Kittawornrat A., Zhou F., Rauh R., Nelson W., O'Connell C., Burrell A., Wang C., Yoon K.J. and Zimmerman J.J., 2013. Probability of detecting influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2 in individual pig nasal swabs and pen-based oral fluid specimens over time. Veterinary Microbiology. Vol. 166 (issue 3-4); pag. 450-60.
6. Holtkamp D.J., Kliebenstein J.B., Neumann E.J., Zimmerman J.J., Rotto H.F., Yoder T.K., Wang C., Yeske P.E., Mowrer C.L. and Haley C.A., 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. Journal of Swine Health and Production. Vol. 21 (issue 2); pag. 72-84.
7. Holtkamp D.J., Polson D.D. and Torremorell M., 2011. Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. Journal of Swine Health and Production. Vol. 19 (issue 1); pag. 44-56.
8. Olsen C., Brown I., Easterday B. and Van Reeth K. 2006 Swine influenza in Diseases of Swine, Straw B., Zimmerman J., D'Allaire S. and Taylor D. (Eds) Blackwell: Oxford. pag. 469-482.
9. Prickett J., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K.J., Evans R.B. and 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. Vol. 20 (issue 2); pag. 156-163.
10. Prickett J.R. and Zimmerman J.J., 2010. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. Anim Health Res Rev. Vol. 11 (issue 2); pag. 207-16.
11. Van Reeth K. and Ma W.J., 2013. Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change-That's the Question. Swine Influenza. Vol. 370; pag. 173-200.