

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

lek. wet. Agata Augustyniak

Przydatność płynu technologicznego w ocenie statusu immunologicznego świń

The usefulness of processing fluid in assessing pigs' immune status

Praca doktorska

Doctoral thesis

Dziedzina: **nauki weterynaryjne**

Dyscyplina: **weterynaria**

Promotor: **prof. dr hab. Małgorzata Pomorska-Mól**

Promotor pomocniczy: **dr n. wet. Ewelina Czyżewska-Dors**

Praca doktorska wykonana w **Katedrze Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych**
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytetu
Przyrodniczego w Poznaniu

Poznań, 2025

Pracę doktorską tworzy jednotematyczny cykl trzech opublikowanych artykułów naukowych, stanowiących załączniki do przedłożonej rozprawy.

Wykaz artykułów wchodzących w skład cyklu:

Wstęp:

1. **Augustyniak A.**, Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Immune status of piglets during the first week of life: Current knowledge, significance and assessment – a review. *Annals of Animal Science*. 2023, 23, 391-403.

MNiSW₂₀₂₃: **200**; IF₂₀₂₃: **1,8**; IF 5-letni (2023): **1,8**

Część badawcza

2. **Augustyniak A.**, Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Concentrations of selected immunological parameters in the serum and processing fluid of suckling piglets and the serum and colostrum of their mothers. *BMC Veterinary Research*. 2024, 20:170.

MNiSW₂₀₂₄: **140**; IF₂₀₂₄: **2,6**; IF 5-letni (2024): **2,7**

3. **Augustyniak A.**, Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Field study on the utility of fluid obtained from testicles as a sample for detecting antibodies to selected swine pathogens. *Scientific Reports*. 2025, 15: 22402

MNiSW₂₀₂₅: **140**; IF₂₀₂₄: **3,9**; IF 5-letni (2024): **4,3**

Łączny Impact Factor (wg roku opublikowania) – **8,3** (w tym prace oryginalne **6,5**)

Suma punktów MNiSW (wg roku opublikowania) – **480** (w tym prace oryginalne **280**)

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS nr 2020/37/B/NZ7/00021 pt. *Nieinwazyjne strategie w monitorowaniu stanu zdrowia zwierząt. Badania nad przydatnością alternatywnych matryc w diagnostyce, epidemiologii i ocenie statusu immunologicznego na modelu świni domowej (*Sus scrofa domestica*).*

Kierownik projektu: prof. dr hab. Małgorzata Pomorska-Mól

Serdeczne podziękowania
dla promotor pracy **prof. dr hab. Małgorzaty Pomorskiej-Mól**
oraz promotor pomocniczej **dr n. wet. Eweliny Czyżewskiej-Dors**
za opiekę naukową, udzieloną pomoc, poświęcony czas oraz życzliwość

dla moich **najbliższych** - za bycie wsparciem

Spis treści

1.	Streszczenie.....	6
2.	Abstract	7
3.	Wykaz skrótów	8
4.	Wprowadzenie	11
4.1.	Ocena statusu immunologicznego	13
4.1.1.	Immunoglobuliny	14
4.1.2.	Cytokiny.....	17
4.1.3.	Białka ostrej fazy	19
4.2.	Próbki wykorzystywane w ocenie statusu immunologicznego świń	21
4.2.1.	Płyn technologiczny.....	23
5.	Hipoteza i cel badań.....	27
6.	Materiał i metody.....	28
6.1.	Eksperyment 1.....	29
6.1.1.	Próbki	29
6.1.2.	Analizy laboratoryjne	30
6.1.3.	Analizy statystyczne	32
6.2.	Eksperyment 2.....	33
6.2.1.	Próbki	33
6.2.2.	Analizy laboratoryjne	33
6.2.3.	Analiza statystyczna	36
7.	Wyniki.....	37
7.1.	Eksperyment 1.....	37
7.1.1.	Immunoglobuliny	37
7.1.2.	Cytokiny.....	39
7.1.3.	Białka ostrej fazy	43
7.2.	Eksperyment 2.....	47
7.2.1.	Przeciwciała przeciwko <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	47
7.2.2.	Przeciwciała przeciwko <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	53
7.2.3.	Przeciwciała przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu E	58
7.2.4.	Przeciwciała przeciwko wirusowi epidemicznej biegunki świń.....	63
7.2.5.	Przeciwciała przeciwko wirusowi grypy typu A.....	65
7.2.6.	Przeciwciała przeciwko <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	71
8.	Dyskusja	76
8.1.	Eksperyment 1.....	76
8.1.1.	Immunoglobuliny	77

8.1.2.	Cytokiny.....	80
8.1.3.	Białka ostrej fazy	83
8.2.	Eksperyment 2.....	87
9.	Podsumowanie.....	94
10.	Wnioski.....	96
11.	Bibliografia	97
12.	Spis rycin i tabel	107
13.	Oświadczenia współautorów publikacji.....	111
14.	Artykuły wchodzące w skład cyklu	115

1. Streszczenie

Ocena statusu immunologicznego jest pomocna w zarządzaniu zdrowiem stada świń. Materiałem rutynowo wykorzystywanym w diagnostyce laboratoryjnej świń jest krew, jednakże jej pobieranie może być problematyczne. Dlatego badania mające na celu identyfikację i ocenę przydatności innych próbek, których pozyskiwanie nie będzie generowało problemów obserwowanych przy pobieraniu krwi, są potrzebne i uzasadnione. Jedną z potencjalnych alternatyw dla krwi w badaniach laboratoryjnych świń jest płyn technologiczny (*ang. processing fluid, PF*).

W pracy doktorskiej przedstawiono wyniki dwóch eksperymentów. W eksperymencie pierwszym oceniono przydatność PF pozyskanego wyłącznie z jąder do oceny stężeń wybranych parametrów immunologicznych: immunoglobulin, cytokin i białek ostrej fazy u prosiąt oraz loch. Badania przeprowadzono z użyciem komercyjnych, gatunkowo swoistych, ilościowych testów ELISA. W eksperymencie drugim oceniono: przydatność PF pozyskanego wyłącznie z jąder do wykrywania swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko wybranym patogenom świń, wraz z oceną użyteczności komercyjnych testów ELISA walidowanych dla surowicy do wykrywania specyficznych przeciwciał w PF oraz przeanalizowano wpływ pulowania próbek PF na otrzymane wyniki.

Uzyskane pionierskie wyniki wskazują na przydatność PF uzyskanego wyłącznie z jąder do oceny stężeń wybranych parametrów immunologicznych u prosiąt oraz potencjalną jego przydatność do pośredniej oceny wybranych parametrów u loch. Dodatkowo, PF uzyskany wyłącznie z jąder może być użyteczną próbką do wykrywania przeciwciał przeciwko ważnym patogenom świń, a wyniki mogą być interpretowane dla całego miotu. Wykazano, że komercyjne testy ELISA walidowane dla krwi mogą, po wprowadzeniu niezbędnych zmian w interpretacji uzyskanych wyników (zmiana punktu odcięcia), być przydatne do wykrywania swoistych przeciwciał w PF oraz, że pulowanie indywidulanych próbek PF może wpływać na wyniki analiz laboratoryjnych w kierunku występowania specyficznych przeciwciał w badaniach z użyciem komercyjnych testów ELISA opracowanych dla surowicy. Z tego powodu interpretacja wyników badań próbek pulowanych powinna być ostrożna, zwłaszcza w przypadku badań jednorazowych.

Słowa kluczowe: płyn technologiczny, immunoglobuliny, przeciwciała, cytokiny, białka ostrej fazy, status immunologiczny, prosięta, locha

2. Abstract

Assessing the immune status helps manage the health of pig herds. The material routinely used in laboratory diagnostics of pigs is blood; however, its collection can be problematic. Therefore, studies aimed at identifying and evaluating alternative types of samples, the collection of which will not generate problems observed during blood collection, are necessary and justified. One of the potential alternatives to blood in laboratory tests of pigs is processing fluid (PF).

In the doctoral thesis, the results of two experiments were presented. In the first experiment, the usefulness of PF obtained exclusively from the testicles for assessing the concentration of selected immunoglobulins, cytokines, and acute phase proteins in piglets and sows was examined. The studies were conducted using commercial, species-specific, quantitative ELISA tests. The second experiment assessed: the usefulness of PF obtained exclusively from testicles for the detection of specific antibodies directed against selected swine pathogens, together with an assessment of the utility of commercial ELISA tests validated for serum for the detection of specific antibodies in PF and analyzed the effect of pooling PF samples on the obtained results.

Our pioneering results indicate the usefulness of PF obtained exclusively from testicles for assessing the concentrations of selected immunological parameters in piglets and their potential usefulness for indirectly assessing selected parameters in sows. In addition, PF obtained exclusively from testicles may be a useful sample for detecting antibodies against important swine pathogens, and the results can be interpreted for the whole litter. It was shown that commercial ELISA tests validated for blood can, after introducing the necessary changes in the interpretation of the obtained results (change of the cut-off point), be useful for detecting specific antibodies in PF and that pooling individual PF samples can affect laboratory analysis results for specific antibodies using commercial ELISA tests developed for serum. For this reason, the interpretation of pooled samples analysis results should be cautious, especially in the case of single analyses.

Keywords: processing fluid, immunoglobulins, antibodies, cytokines, acute phase proteins, immune status, piglets, sow

3. Wykaz skrótów

App – łac. *Actinobacillus peluropneumoniae*

APP – (ang. *acute phase proteins*) – białka ostrej fazy

AUC – (ang. *area under the curve*) – pole powierzchni pod krzywą

BMI – (ang. *body mass index*) – indeks masy ciała

CI – (ang. *confidence interval*) – przedział ufności

CRP – (ang. *C-reactive protein*) – białko C reaktywne

CV – (ang. *coefficient of variation*) – współczynnik zmienności

EFTA – (ang. *European Free Trade Association*) – Europejskie Stowarzyszenie Wolnego Handlu

ELISA – (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny

Ery – łac. *Erysipelothrix rhusiopathiae*

EU – (ang. *European Union*) – Unia Europejska

GALT - (ang. *gut-associated lymphoid tissue*) – tkanka limfatyczna związana z jelitami

GM-CSF – (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

HEV – (ang. *hepatitis E virus*) – wirus zapalenia wątroby typu E

Hp – (ang. *haptoglobin*) - haptoglobina

IAV – (ang. *influenza A virus*) – wirus grypy typu A

Ig – (ang. *immunoglobulins*) - immunoglobuliny

IL – (ang. *interleukin*) - interleukina

IFN- γ – (ang. *interferon gamma*) - interferon gamma

IRPC – (ang. *relative index positive to control*) – względny stosunek sygnału próby do sygnału kontroli pozytywnej

Krzywa ROC – (ang. *receiver operating characteristic curve*) - krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika

MDA – (ang. *maternally-derived antibodies*) – przeciwciała matczyne

MDI – (ang. *maternally-derived immunity*) – odporność matczyna

Mhp – łac. *Mycoplasma hyopneumoniae*

MJ – (ang. *meat juice*) – sok mięśniowy

MMA (łac. *mastitis, metritis, agalactia*) - zapalenie gruczołu mlekowego, zapalenie błony śluzowej macicy, bezmleczność

mRNA – (ang. *messenger ribonucleic acid*) - matrycowy kwas rybonukleinowy

nAb – (ang. *natural antibodies*) – przeciwciała naturalne

NPV – (ang. *negative predictive value*) – ujemna wartość predykcyjna

OD – (ang. *optical density*) – gęstość optyczna

OF – (ang. *oral fluid*) – płyn ustny

OT – (ang. *optimal threshold*) – optymalny punkt odcięcia

Pig MAP – (ang. *porcine major acute protein*) – brak oficjalnej nazwy w języku polskim

PCR – (ang. *polimerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy

PEDV – (ang. *procine epidemic diarrhoea virus*) – wirus epidemicznej biegunki świń

PPV – (ang. *positive predictive value*) – dodatnia wartość predykcyjna

PRRSV – (ang. *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*) – wirus zespołu rozrodczo-oddechowego

PF – (ang. *processing fluid*) – płyn technologiczny

r_s - (ang. *Spearman's rank correlation coefficient*) - współczynnik korelacji rang Spearman'a

SAA – (ang. *serum amyloid A*) – surowiczy amyloid A

SD – (ang. *standard deviation*) – odchylenie standardowe

S/N – (ang. *sample to negative*) – stosunek sygnału próby do sygnału kontroli negatywnej w teście ELISA

S/P – (ang. *sample to positive*) – stosunek sygnału próby do sygnału kontroli pozytywnej w teście ELISA

TGF- β – (ang. *transforming growth factor beta*) – transformujący czynnik wzrostu beta

TNF- α – (ang. *tumor necrosis factor alpha*) – czynnik martwicy nowotworów alfa

4. Wprowadzenie

W momencie narodzin prosięta dysponują pewną pulą komórkowych oraz pozakomórkowych mechanizmów odpornościowych, które w razie potrzeby mogą być uruchomione w reakcji np. na wniknięcie patogenów. Mimo tego, głównie ze względu na znaczną niedojrzałość układu immunologicznego, nowo narodzone prosięta nie są w stanie skutecznie odpowiedzieć na zakażenie. Poszczególne struktury wchodzące w skład tkanki limfatycznej związanej z jelitami (ang. *gut-associated lymphoid tissue*, GALT) różnią się wielkością, budową oraz liczbą zasiedlających je komórek produkujących immunoglobuliny (Ig, przeciwciała) (Bianchi i wsp., 1999; Solano-Aguilar i wsp., 2000; Schnapper i wsp., 2002; Levast i wsp., 2014). U nowo narodzonych prosiąt całkowita liczba leukocytów we krwi obwodowej jest prawie dwukrotnie niższa w porównaniu do świń w końcowym okresie tuczu i do 28 dnia życia pozostaje znacząco niższa w porównaniu do starszych zwierząt (Pomorska-Mól i Markowska-Daniel, 2011). W trakcie życia płodowego, stymulacja antygenowa układu immunologicznego jest mocno ograniczona lub nie ma jej wcale (Klobasa i wsp., 1986; Bandrick i wsp., 2014). Z tego względu, u nowo narodzonego prosięcia dominującą pulą limfocytów T są limfocyty naiwne, a populacja komórek efektorowych oraz pamięci immunologicznej jest minimalna (Stepanova i wsp., 2007; Pomorska-Mól i Markowska-Daniel, 2011). Podobnie, frakcja limfocytów B składa się z komórek niedojrzałych (Šinkora J. i wsp., 1998; Šinkora i Butler, 2009). Powyższe skutkuje tym, że prosięta w okresie neonatalnym są zdolne do rozwinięcia nie w pełni efektywnej, pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Rozwój tego typu odpowiedzi trwa zbyt długo w porównaniu do tempa namnażania patogenów, na które prosięta mogą być ekspozowane tuż po narodzinach (Salmon i wsp., 2009). Dla przykładu, zaobserwowano, że przeciwciała produkowane przez prosięta *de novo* zaczynają się pojawiać dopiero od 6 dnia życia (Klobasa i wsp., 1989; Rooke i wsp., 2003). Dlatego, pomimo że prosięta rodzą się immunokompetentne, to w praktyce, w ciągu pierwszych tygodni życia, nie są w stanie rozwinąć efektywnej odpowiedzi immunologicznej. Stąd, do czasu wykształcenia i uzyskania pełnej dojrzałości własnych mechanizmów odpornościowych, polegają w zasadzie wyłącznie na odporności biernej przekazanej im przez matkę (Salmon i wsp., 2009; Bandrick i wsp., 2014). Przyjmuje się, że zdolność do wykształcenia efektywnej odpowiedzi immunologicznej prosięta osiągają około 28 dnia życia (Salmon i wsp., 2009; Martínez-Boixaderas i wsp., 2022).

Sześciowarstwowe, nabłonkowo-kosmówkowe łożysko występujące u świń, całkowicie uniemożliwia transfer dużych cząsteczek, w tym elementów odpornościowych, jak np. Ig (Klobasa i wsp., 1981; Klobasa i wsp., 1986; Šinkora M. i wsp., 1998; Šinkora i Butler, 2009; Bandrick i wsp., 2014). Głównym źródłem odporności dla prosiąt jest siara i tzw. odporność matczyzna (ang. *maternally-derived immunity*, MDI) (Klobasa i wsp., 1981; Bandrick i wsp., 2014), stanowiąca pierwszą wydzielinę gruczołu mlekowego, uwalnianą zwykle w ciągu pierwszych 24 godzin od porodu (Inoue i Tsukahara, 2021). Siara lochy zawiera rozmaite komponenty immunologiczne, m.in. przeciwciała, komórki odpornościowe (limfocyty, fagocyty), składowe układu dopełniacza, cytokiny, czynniki wzrostu, czy hormony (Salmon i wsp., 2009; Bandrick i wsp., 2014, Inoue i Tsukahara, 2021). Najważniejszą składową MDI przekazywanej wraz z siarą są przeciwciała matczyne (ang. *maternally-derived antibodies*, MDA), które zapewniają prosiętom ochronę do czasu wykształcenia własnych mechanizmów odpowiedzi adaptacyjnej. Dla przykładu, wykazano, że wśród prosiąt, u których stężenie IgG w surowicy pobieranej między 48 a 72 godziną życia wynosiło 1000 mg/dl lub mniej, przeżywalność w okresie 16-20 dnia życia wynosiła jedynie 67%, podczas gdy wśród prosiąt, u których stężenia IgG mieściły się w przedziale 2250-2500 mg/dl, współczynnik ten wzrastał do 89% (Cabrera i wsp., 2012). Uważa się, że MDA mają także istotny wpływ na rozwój układu odpornościowego. Podejrzewa się, że ilość endogennie produkowanych IgG przez prosięta w 7 dniu życia jest dodatnio skorelowana z ilością zaabsorbowanych przez nie siarowych IgG (Rooke i wsp., 2003). Zaobserwowano także pozytywną zależność pomiędzy stężeniem IgG w surowicy prosiąt 24 godziny po urodzeniu, a z ich stężeniem w okresie odsadzeniowym (Devillers i wsp., 2011). Co więcej, odnotowano także pozytywne związki w stężeniu IgG między surowicami prosiąt w 7 a 28 i 56 dniu życia (Rooke i wsp., 2003; Markowska-Daniel i wsp., 2010). Pozostałe komponenty MDI świń również uczestniczą w ochronie przed chorobami zakaźnymi oraz wykazują efekt immunoregulacyjny i wpływają na dojrzewanie miejscowych i ogólnoustrojowych mechanizmów odpornościowych, jednakże ich transfer i rola są poznane i opisane w dużo mniejszym stopniu (Salmon i wsp., 2009; Bandrick i wsp., 2014; Inoue i Tsukahara, 2021).

Śmiertelność prosiąt stanowi istotny problem w hodowli trzody chlewnej. Według danych, wskaźnik ten wynosi około 20% w okresie przedodsadzeniowym, z czego ponad połowa padnięć ma miejsce w ciągu pierwszych 3 dni życia (Devillers i wsp., 2011).

Za jedną z najważniejszych przyczyn padnięć prosiąt w tym okresie uważa się pobranie niewystarczających objętości siary, dlatego pobranie przez nowo narodzone prosięta odpowiednich ilości wysokiej jakości siary, jest kwestią kluczową, warunkującą ich przeżycie oraz dalszy rozwój i wzrost (Devillers i wsp., 2011).

Narzędziem pomocnym w zarządzaniu zdrowiem prosiąt na wczesnych etapach życia, a w szerszym aspekcie zdrowiem całego stada, jest ocena ich statusu immunologicznego.

4.1. Ocena statusu immunologicznego

Ocena statusu immunologicznego nowo narodzonych prosiąt może nieść ze sobą istotne korzyści, poprzez odpowiednio wczesne wykrycie rozmaitych nieprawidłowości związanych ze zdrowiem lochy i prosiąt, co w rezultacie pozwoli na szybsze wdrożenie działań naprawczych. Odpowiednio zaprojektowane badania pozwalają m.in. wykryć nieprawidłowości związane z laktacją loch, zaburzeniami transferu MDI, czy nieprawidłowo zaplanowanego programu szczepień wśród matek. W ocenie statusu immunologicznego prosiąt pod uwagę bierze się najczęściej jeden składnik odpowiedzi odpornościowej – odpowiedź typu humoralnego reprezentowaną przez przeciwciała, z uwzględnieniem ich stężenia i czasu utrzymywania się, gdyż to one reprezentują najistotniejszy pod względem immunologicznym element MDI. W literaturze spora część uwagi została poświęcona zagadnieniom związanym z transferem ogólnej puli przeciwciał poszczególnych klas. Niemniej w praktyce, równie, jeśli nie bardziej pożądane, może okazać się oznaczanie przeciwciał specyficznych. Z uwagi na fakt, że prawie 100% przeciwciał znajdujących się w krwioobiegu nowo narodzonych prosiąt w tym okresie stanowią MDA, oznaczanie swoistych przeciwciał pozwala także na monitoring występowania patogenów czy skuteczności szczepień w obrębie stada. Bardziej szczegółowa analiza parametrów immunologicznych w okresie neonatalnym, obejmująca m. in. cytokiny lub białka ostrej fazy (ang. *acute phase proteins*, APP) pozwoliłaby na głębsze poznanie znaczenia MDI zarówno dla nowonarodzonych prosiąt jak i dla ich wzrostu i rozwoju na dalszych etapach życia. Dodatkowo, dostępne dane wskazują, że cytokiny i APP mogą być wykorzystywane u świń jako markery stanu zapalnego, zakażeń, czy skuteczności wdrożonych terapii (Saco i Bassols, 2022). Uwzględnienie tych parametrów w ocenie statusu immunologicznego prosiąt pozwoliłoby na uzyskanie dodatkowych informacji odnośnie statusu zdrowotnego stada.

4.1.1. Immunoglobuliny

4.1.1.1. Immunoglobuliny klas IgA, M i G

Jednym ze sposobów oceny statusu immunologicznego prosiąt jest ocena stężeń Ig (lub poszczególnych klas Ig) w surowicy. Ig są białkami wytwarzanymi przez komórki plazmatyczne, stanowiące pobudzone limfocyty B. Zadaniem Ig jest neutralizacja drobnoustrojów lub też produkowanych przez nie toksyn, które znajdują się pozakomórkowo, we krwi lub na powierzchni błon śluzowych (Janeway i wsp., 2001). Mechanizmy odpornościowe oparte na przeciwciałach są zaliczane do mechanizmów swoistych, typu humoralnego. Z uwagi na różnice w budowie i funkcji, można wyróżnić kilka klas (izotypów) Ig. Podstawową i główną klasą Ig biorącą udział w reakcjach odpornościowych jest IgG. IgA jest związana głównie z zapewnianiem odporności miejscowej, związanej z błonami śluzowymi, natomiast IgM jest produkowana na wczesnych etapach reakcji odpornościowej (Janeway i wsp., 2001). Dostępne dane wskazują, że świnia jest w stanie produkować przeciwciała już na etapie rozwoju płodowego (Cukrowska i wsp., 1996a; Cukrowska i wsp., 1996b). Obecność niewielkich stężeń Ig trzech klas, ze zdecydowaną przewagą IgM, została potwierdzona w surowicy płodów w 44 dniu życia płodowego, a ich stężenie rosło wraz z trwaniem ciąży (Cukrowska i wsp., 1996a). Ponadto, limfocyty B pozyskane z wątroby płodów z tego etapu życia prenatalnego, reagowały na stymulację antygenową produkcją IgM (Cukrowska i wsp., 1996a). Należy jednak zaznaczyć, że są to tzw. przeciwciała naturalne (ang. *natural antibodies*, nAb), które powstawały spontanicznie, niezależnie od ekspozycji na antygeny środowiska zewnętrznego i wykazywały funkcjonalnie różnice od przeciwciał wytwarzanych w rezultacie stymulacji antygenami, manifestujące się m.in. brakiem specyficzności w stosunku do antygenów – nAb wykazywały polireaktywność, wiążąc się z dwoma lub trzema różnymi antygenami oraz wykazywaniem powinowactwa do antygenów własnego organizmu (Cukrowska i wsp., 1996a). Uważa się, że nAb mogą pełnić funkcje ochronne w organizmach nowo narodzonych prosiąt, jednakże ich rola ochronna jest niewystarczająca (Martínez-Boixaderas i wsp., 2022). Spontaniczna zdolność produkcji przeciwciał została wykryta także w przypadku limfocytów B pobranych ze śledziony i grasicy 67-dniowych płodów świń (Cukrowska i wsp., 1996b). Komórki pozyskane ze śledziony, podobnie jak limfocyty B pobrane z wątroby, produkowały IgM. Natomiast w przypadku limfocytów B pochodzących z grasicy, zaobserwowano zjawisko przełączania klas, co skutkowało produkcją IgG oraz IgA (Cukrowska i wsp., 1996b). W przypadku limfocytów B

pozyskanych ze śledziony, zjawisko to miało miejsce dopiero przy ekspozycji na stymulację antygenową (Cukrowska i wsp., 1996b). Niemniej, wyniki licznych badań wskazują, że prosięta rodzą się ze stężeniami przeciwciał bliskimi zeru, co sugeruje, że produkcja przeciwciał zachodząca w trakcie życia płodowego ma marginalne znaczenie (Porter, 1969; Curtis i Bourne, 1970; Frenyó i wsp., 1981; Martin i wsp., 2005; Markowska-Daniel i wsp., 2010; Bandrick i wsp., 2014).

Jak już wspomniano, z uwagi na niedojrzałość własnego układu immunologicznego nowo narodzonego prosięcia, ochrona przed chorobotwórczymi drobnoustrojami opiera się na mechanizmach odporności biernej, której najważniejszą składową są MDA, dostarczane głównie z siarą, a następnie w pewnym stopniu także z mlekiem. Siara lochy zawiera trzy klasy przeciwciał – IgG, IgA oraz IgM (Poter, 1969; Curtis i Bourne, 1970; Klobasa i wsp., 1987; Markowska-Daniel i Pomorska-Mól, 2010). Przeciwciała mogą przedostawać się do siary z surowicy lochy (prawie 100% IgG oraz ponad 85% IgM) lub też mogą być produkowane w gruczole mlekowym (ponad 50% IgA) (Bourne i Curtis, 1973). Dominującą klasą przeciwciał siary lochy jest IgG, której stężenie znacząco przewyższa stężenie IgA oraz IgM (Poter i wsp., 1969; Curtis i Bourne, 1970; Klobasa i wsp., 1987; Markowska-Daniel i wsp., 2010; Markowska-Daniel i Pomorska-Mól, 2010). Wraz z przekształcaniem się siary w mleko dochodzi do zmian w stężeniach poszczególnych klas przeciwciał i dominującą klasą staje się IgA (Curtis i Bourne, 1970; Klobasa i wsp., 1987; Markowska-Daniel i Pomorska-Mól, 2010). Na stężenie MDA w surowicy prosiąt, które spożyły siarę wpływa kilka czynników, takich jak m.in. czas w jakim prosięta pobiorą siarę, spożyta objętość oraz stężenie zawartych w niej MDA (Rooke i Bland, 2002; Bandrick i wsp., 2014; Klobasa i wsp., 1981; Devillers i wsp., 2011; Kielland i wsp., 2015). MDA są wchłaniane do krążenia ogólnego w jelicie prosiąt na drodze niespecyficzej pinocytozy (Rooke i Bland, 2002). Istotną rolę w tym procesie odgrywa zawarty w siarze inhibitor trypsyny, który chroni MDA przed strawieniem. Wraz z upływem czasu dochodzi do spadku jego stężenia w siarze, a co za tym idzie, ochronnego działania w stosunku do zawartych w niej MDA (Jensen and Pedersen, 1979). Dodatkowo, już w 24 godziny od urodzenia może dochodzić do uszczelnienia ściany jelita prosięcia i tym samym zahamowania wchłaniania przeciwciał (Rooke i Bland, 2002). W ciągu pierwszych 24 godzin od rozpoczęcia porodu dochodzi także do gwałtownego spadku stężeń zawartych w siarze przeciwciał, z czego najbardziej drastyczny spadek jest obserwowany w przypadku IgG (Frenyó i wsp., 1981; Klobasa i wsp., 1987; Bland i wsp., 1999; Markowska-Daniel

i wsp., 2010; Quesnel, 2011; Markowska-Daniel i Pomorska-Mól, 2010; Kielland i wsp., 2015; Inoue i Tsukahara, 2021). Dlatego tak kluczowe jest pobranie przez prosię odpowiedniej objętości siary w jak najkrótszym czasie po urodzeniu. Stężenie zawartych w sianie MDA różni się między lochami i jest warunkowane przez m. in. kolejność miotu danej lochy (siara pierwiastek zawiera niższe stężenia IgG oraz IgA w porównaniu do wieloródek), jej wieku, genotypu, żywienia, równowagi hormonalnej, przeprowadzanych szczepień oraz zarządzania stadem (Frenyó i wsp., 1981; Klobasa i wsp., 1986; Bland i wsp., 1999; Cabrera i wsp., 2012; Kielland i wsp., 2015). Jak wskazują dane, wpływ na finalne stężenie MDA w surowicy prosiąt ma wiele czynników, związanych z lochą, prosięciem oraz zarządzaniem stadem (Devillers i wsp., 2011; Kielland i wsp., 2015).

4.1.1.2. Przeciwciała swoiste dla ważnych patogenów świń

Poza ogólną oceną stężeń Ig, bez oznaczania ich swoistości, dużą wagę przywiązuje się do zabezpieczenia prosiąt w pulę swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko najważniejszym patogenom. Przeciwciała swoiste, w tym te skierowane przeciwko różnym drobnoustrojom chorobotwórczym są przekazywane prosięciu przez matkę i stanowią bardzo ważny element MDI (o ile nie najważniejszy) zwłaszcza w pierwszych dniach życia prosiąt. Należy podkreślić, że swoiste MDA będą zapewniać ochronę wyłącznie przeciwko tym patogenom, w stosunku do których locha została uodporniona lub z którymi miała kontakt. Dlatego wczesna ocena statusu immunologicznego prosiąt może być pomocnym narzędziem w planowaniu i wprowadzaniu optymalnych programów szczepień, które pozwolą na jak najskuteczniejsze zabezpieczenie prosiąt przed występującymi w stadzie drobnoustrojami chorobotwórczymi. Analiza występowania MDA w ramach wczesnej oceny statusu immunologicznego prosiąt może być przydatna nie tylko w odniesieniu do planowania programu szczepień matek, ale i samych prosiąt. Długo utrzymujące się wysokie stężenia MDA mogą wywoływać niekorzystne zjawisko interferencji z odpornością poszczepienną. Jest ono definiowane jako zdolność obecnych w krążeniu prosięcia MDA do opóźniania lub blokowania rozwoju odpowiedzi immunologicznej w reakcji na szczepionkę (Martínez-Boixaderas i wsp., 2022). Uważa się, że u podstaw jej rozwoju leżą różne mechanizmy, takie jak neutralizacja antygeny szczepionkowego lub obniżenie syntezy Ig (Martínez-Boixaderas i wsp., 2022). Udowodniono, że do rozwoju zjawiska interferencji dochodzi przy stosowaniu szczepionek inaktywowanych, jak i żywych. Ocena utrzymywania się MDA w krążeniu prosiąt może być

przeprowadzana z uwzględnieniem czasu utrzymywania się specyficznych przeciwciał lub okresu półtrwania. Czas utrzymywania się MDA odnosi się do wieku prosiąt, w jakim poziom MDA spada poniżej progu wykrywalności w testach laboratoryjnych, natomiast okres półtrwania jest czasem potrzebnym do spadku ich stężenia o 50% w stosunku do wartości początkowych (Martínez-Boixaderas i wsp., 2022). Przyjmuje się, że idealnym momentem na przeprowadzenie szczepień u prosiąt jest czas, kiedy poziom MDI obniżył się na tyle, by umożliwić rozwój odpowiedzi odpornościowej w reakcji na antygen szczepionkowy, ale by nie był zerowy, tak, żeby prosię nie pozostawało bezbronne w obliczu zakażenia. Niemniej, wyznaczenie takiego optymalnego momentu nie jest proste. Wyniki dostępnych badań wskazują, że czas utrzymywania się MDA w krążeniu prosięcia jest mocno zróżnicowany pomiędzy patogenami przeciwko którym są one skierowane i może wahać się od 2 tygodni do nawet 6 miesięcy (Augustyniak i Pomorska-Mól, 2023). Ocena występowania specyficznych przeciwciał w ramach wczesnej oceny statusu immunologicznego prosiąt może dostarczać informacji przydatnych przy układaniu programu szczepień prosiąt. Z uwagi na fakt, że przeciwciała występujące w pierwszym okresie życia w krwioobiegu prosiąt pochodzą w całości od matki, badanie poziomu swoistych przeciwciał w próbkach pobranych od prosiąt może służyć do monitorowania wybranych patogenów w stadzie oraz do oceny transferu przeciwciał matczynych i efektywności immunoprofilaktyki loch.

4.1.2. Cytokiny

Cytokiny są grupą rozpuszczalnych białek o niewielkiej masie cząsteczkowej (6-70 kDa), produkowanymi w większości przez leukocyty (m.in. makrofagi, limfocyty, komórki dendrytyczne), ale także inne grupy komórek jak np. komórki śródbłónka czy fibroblasty (Abbas i wsp., 2019; Liu i wsp., 2021). Regulują one odpowiedź immunologiczną organizmu poprzez oddziaływanie na rozmaite komórki (komórki układu odpornościowego, inne komórki organizmu, np. komórki wątroby, komórki śródbłónka) i wywieranie na nie różnorodnych efektów (Abbas i wsp., 2019; Liu i wsp., 2021). Cytokiny są zatem mediatorami pozwalającymi na komunikację pomiędzy poszczególnymi typami komórek. W większości wykazują działania autokrynowe (działanie na komórki, przez które zostały wyprodukowane) lub parakrynowe (działanie na okoliczne komórki), ale są one w stanie działać także na poziomie endokrynowym, czyli w dalszej odległości od miejsca produkcji, co jest obserwowane np. przy zadziałaniu wrodzonych mechanizmów odpornościowych w reakcji na zakażenie (Abbas i wsp.,

2019). Po ustaniu działania czynnika stymulującego, produkcja cytokin ulega zahamowaniu, a same cytokiny charakteryzują się dosyć krótkim okresem półtrwania (Liu i wsp., 2021). Istnieje wiele klasyfikacji tej grupy białek. Jedna z nich jest tworzona w oparciu o pełnione przez cytokiny funkcje – wyróżniamy m. in. interleukiny (ang. *interleukin*, IL, pośredniczą w komunikacji pomiędzy leukocytami), interferony (ang. *interferon*, IFN, szczególnie istotne w zwalczaniu infekcji wirusowych, aktualnie zaliczane do cytokin), chemokiny (ułatwiają migrację leukocytów z krwi, do miejsca infekcji), czy czynniki martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*, TNF, grupa o zróżnicowanym wachlarzu działań) (De Andrea i wsp., 2002; Akdis i wsp., 2010; Chu, 2013). Funkcjonuje także inny podział, w którym cytokiny są przypisywane do jednej z dwóch grup, w zależności od tego, czy prowadzą one do rozwoju (cytokiny prozapalne np. IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α) lub ograniczania (cytokiny przeciwzapalne, np. IL-4, IL-10) stanu zapalnego (Dinarello, 2000; Liu i wsp., 2021). Jeszcze inny podział jest tworzony w oparciu o rodzaj limfocytów T pomocniczych CD4⁺, przez które dane cytokiny mogą być produkowane – m.in. Th1 (np. IFN- γ), Th2 (np. IL-4) lub Th17 i w związku z tym, w jaki typ reakcji odpornościowej mogą być zaangażowane (Nguyen i wsp., 2007; Abbas i wsp., 2019; Liu i wsp., 2021). Zmiany w stężeniach poszczególnych cytokin w różnych płynach ustrojowych (krew, surowica) czy też wydzielinach (ślina, pot) lub wydalinach (kał) mogą dostarczać istotnych informacji odnośnie stanu organizmu, pomocnych przy stawianiu diagnozy, ocenie przebiegu choroby czy dobieraniu terapii (Liu i wsp., 2021). Dostępna literatura wskazuje, że oznaczanie stężeń cytokin w surowicy świń może potencjalnie być użyteczne przy rozróżnianiu tła infekcji (bakteryjne vs. wirusowe), do określania skuteczności postępowania terapeutycznego, jako markery subklinicznej postaci *coliform mastitis*, czy wczesnego wykrywania syndromu MMA (łac. *mastitis, metritis, agalactia*, zapalenie gruczołu mlekowego, zapalenie błony śluzowej macicy, bezmleczność) (Fossum, 1998; Fossum i wsp., 1998; Hultén i wsp., 2003; Zhu i wsp., 2003; Szczubiał i Urban-Chmiel, 2008).

Jak wskazują dane, nowo narodzone prosięta są w stanie endogennie produkować jedynie niektóre z cytokin, jak IL-12 oraz transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor β* , TGF- β) (Nguyen i wsp., 2007). W badaniu, w którym prosiętom zamiast siary podawano preparat mlekozastępczy obserwowano w ich organizmach o wiele niższe stężenia szeregu cytokin w porównaniu do prosiąt

pobierających siarę (Maciag i wsp., 2022). Przyjmuje się, że cytokiny, które są wykrywane w krążeniu prosiąt w okresie neonatalnym w większości stanowią składnik MDI dostarczany im wraz z siarą (Nguyen i wsp., 2007; Maciag i wsp., 2022). Siara lochy zawiera szereg cytokin, w tym IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ , TGF- β , TNF- α oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (Nguyen i wsp., 2007; Maciag i wsp., 2022). Badania wskazują, że siara wieloródek zawiera wyższe stężenia cytokin w porównaniu do siary pierwiastek (Maciag i wsp., 2022). Podobnie jak w przypadku przeciwciał, w odniesieniu do wybranych cytokin wykazano, że ich zawartość w wydzielinie gruczołu mlekowego spada wraz z czasem upływającym od porodu oraz, że są one wchłaniane do krwioobiegu w znaczącym stopniu jedynie do momentu uszczelnienia bariery jelitowej (Nguyen i wsp., 2007). Pewna część cytokin znajdujących się w krwioobiegu prosiąt może być także produkowana przez komórki pobrane z siarą i następnie wchłonięte z przewodu pokarmowego (Nguyen i wsp., 2007). W porównaniu do przeciwciał, transfer cytokin wraz z siarą oraz ich wpływ na układ immunologiczny prosięcia jest dużo słabiej poznany. Aktualnie przyjmuje się, że cytokiny pobierane z siarą, pełnią rolę w dojrzewaniu układu odpornościowego prosięcia (Nguyen i wsp., 2007; Maciag i wsp., 2022).

4.1.3. Białka ostrej fazy

Reakcja ostrej fazy jest niespecyficzną reakcją organizmu na zaburzenie jego homeostazy, spowodowanej różnymi czynnikami, m.in. tła zakaźnego (Pomorska-Mól i wsp., 2014a). Jedną z jej składowych jest zmiana w stężeniach APP. Wyróżnia się dwie podstawowe grupy APP - białka, których stężenie pod wpływem rozwoju stanu zapalnego będzie rosło w stosunku do wartości spoczynkowych nazywa się pozytywnymi APP, natomiast te, których stężenie będzie spadać – negatywnymi APP (Saco i Bassolos, 2022). Głównym miejscem syntezy tej grupy białek jest wątroba (Murata i wsp., 2004; Jain i wsp., 2010). Produkcja APP jest indukowana przez cytokiny prozapalne, m.in. IL-1, IL-6 lub TNF- α uwalniane głównie przez makrofagi w miejscu infekcji (Murata i wsp., 2004; Jain i wsp., 2010). Dokładna aktywność biologiczna APP pozostaje wciąż nie do końca poznana, jednakże uważa się, że APP stanowią element odporności wrodzonej, zaangażowany w przywracanie homeostazy, kontrolowanie reakcji zapalnej i hamowanie wzrostu drobnoustrojów do czasu rozwinięcia i uruchomienia mechanizmów odporności swoistej (Murata i wsp., 2004; Pomorska-Mól i wsp., 2012a).

Co istotne, wzorce zmian stężeń poszczególnych APP mogą być różne w zależności od gatunku zwierzęcia (Petersen i wsp., 2004; Saco i Bassolos, 2022). W przypadku świni, do głównych, pozytywnych APP zaliczamy białko C-reaktywne (ang. *C-reactive protein*, CRP), surowiczy amyloid A (ang. *serum amyloid A*, SAA), haptoglobinę (ang. *haptoglobin*, Hp) oraz Pig-MAP (ang. *porcine major acute phase protein*, brak oficjalnej nazwy w języku polskim) (Saco i Bassolos, 2022). Stężenia CRP wzrastają bardzo gwałtownie, w krótkim czasie od zadziałania czynnika wywołującego reakcję zapalną (Petersen i wsp., 2004; Jain i wsp., 2010; Saco i Bassolos, 2022). Białko to ma wiele funkcji m.in. aktywacja elementów układu dopełniacza, opsonizacja, czy modyfikacja funkcji neutrofilii i makrofagów (Petersen i wsp., 2004; Jain i wsp., 2010). Podobnie do CRP, szybko wzrasta poziom SAA (Sacco i Bassolos, 2022). Białku temu przypisuje się wiele ról jak np. pobudzanie chemotaksji monocytów, limfocytów i granulocytów oraz zahamowanie aglutynacji płytek (Petersen i wsp., 2004), jednakże jego rola w obronie gospodarza w trakcie zapalenia pozostaje nie do końca poznana. W przeciwieństwie do dwóch wcześniej omówionych białek, stężenie Hp wzrasta wolniej, z reguły kilka dni od powstania stanu zapalnego i utrzymuje się na podwyższonym poziomie przez dłuższy czas (Pomorska-Mól i wsp., 2011a; Saco i Bassolos, 2022). Zasadniczą rolą Hp jest wiązanie hemoglobiny uwalnianej z uszkodzonych erytrocytów w celu zapobiegania m.in. powstawaniu uszkodzeń mięszu nerek oraz wiązaniu uwalnianego żelaza, by m.in. ograniczyć jego dostępność dla bakterii (Murata i wsp., 2004; Petersen i wsp., 2004). Ponadto, Hp przypisywane są także inne właściwości jak wywoływanie efektu immunomodulacyjnego (Petersen i wsp., 2004). Stężenie Pig-MAP również wzrasta wolniej, ale utrzymuje się na podwyższonym poziomie przez dłuższy czas (Pomorska-Mól i wsp., 2011a; Saco i Bassolos, 2022). Białko to charakteryzuje się dużą reaktywnością w przypadku wystąpienia stanu zapalnego lub zakażenia bakteryjnego, jednakże dokładny mechanizm działania tego APP nie został do końca wyjaśniony. Pomiar stężeń APP w surowicy może dostarczać istotnych informacji odnośnie stanu zdrowia świń. Dodatkowo, w porównaniu do cytokin, APP jako wskaźnik diagnostyczny zdają się mieć pewną przewagę, ze względu na większą stabilność i dłuższy czas utrzymywania się w surowicy (Saco i Bassolos, 2022). Wyniki dostępnych badań sugerują potencjalną przydatność APP m.in. do wykrywania zakażeń jeszcze przed rozwojem objawów klinicznych, jako markerów stopnia zaawansowania procesu chorobowego, oceny skuteczności postępowania terapeutycznego, markerów zaburzeń laktacji u loch prośnych, czy do wyboru

optymalnego preparatu lub protokołu szczepień (Hultén i wsp., 2003; Pomorska-Mól i wsp., 2011; Pomorska-Mól i wsp., 2012b; Pomorska-Mól i wsp., 2014a; Pomorska-Mól i wsp., 2014b; Pomorska-Mól i wsp., 2015; Kaiser i wsp., 2018; Hernández-Caravaca i wsp., 2017; Wierzchosławski i wsp., 2018). Dane literaturowe wskazują, że poza surowicą, także inne rodzaje próbek, jak ślina czy sok mięśniowy (ang. *meat juice*, MJ) u świń lub mleko u krów, mogą być przydatne do oznaczania stężeń APP (Saco i Bassolos, 2022).

W okresie okołoporodowym w surowicy lochy dochodzi do wzrostu stężeń głównych APP (Wierzchosławski i wsp., 2018), co najprawdopodobniej jest związane ze stresem, wysiłkiem i/lub urazem tkanek kanału rodowego spowodowanym przez rodzące się prosięta i podejmowane interwencje położnicze (Kaiser i wsp., 2018). Obecność niektórych APP została potwierdzona w sianie i surowicy tygodniowych prosiąt (Martin i wsp., 2005; Hiss-Pesch i wsp., 2011; Pomorska-Mól i wsp., 2011; Werner i wsp., 2014), jednakże dane dotyczące ich stężeń w tych płynach biologicznych są mocno ograniczone. Porównywanie wartości uzyskanych w poszczególnych doświadczeniach może być trudne z uwagi na m.in. różnice w układzie doświadczeń, rodzaj wykorzystywanych zwierząt, czy też wykorzystywaną technikę laboratoryjną do oznaczania poszczególnych parametrów. Niewiele także wiadomo na temat samego transferu APP od matki do potomstwa oraz roli jaką ta grupa białek może pełnić w organizmie nowo narodzonego prosięcia. Spekuluje się, że Hp może wywoływać efekt immunomodulacyjny u prosiąt (Hiss-Pesch i wsp., 2011).

4.2. Próbkę wykorzystywane w ocenie statusu immunologicznego świń

Materiałem diagnostycznym rutynowo wykorzystywanym do badań laboratoryjnych świń jest krew. Jednakże proces pobierania krwi u świń w różnym wieku może przyczyniać się do wystąpienia różnego rodzaju problemów. Po pierwsze, pobieranie indywidulanych próbek krwi jest procedurą praco- i czasochłonną co powoduje, że jest ona dosyć kosztowna. Do pobrania krwi konieczne jest zaangażowanie co najmniej dwóch osób. Ponadto, może ono się wiązać z potencjalnym ryzykiem dla osób pobierających, w szczególności, gdy krew jest pobierana od loch, knurów lub zwierząt utrzymywanych w grupie. Sama procedura jest także stresująca dla świń i może zaburzać ich dobrostan.

Pobieranie krwi od prosiąt w pierwszych dniach życia jest obarczone zwiększonym ryzykiem padnięć. Z tych powodów, ocena statusu immunologicznego prosiąt może być odkładana na późniejsze etapy życia lub też dochodzi do całkowitej rezygnacji z jego oceny, co może mieć negatywne konsekwencje dla zdrowia i rozwoju prosiąt, a w szerszym ujęciu dla zdrowia całego stada. Z uwagi na to, badania mające na celu zidentyfikowanie alternatywnych dla krwi rodzajów materiału diagnostycznego (próbek), które byłyby przydatne do oceny statusu immunologicznego prosiąt, a których pobieranie nie wiązałoby się z potencjalnymi problemami obserwowanymi przy pobieraniu krwi są uzasadnione i potrzebne. Na przestrzeni ostatnich lat opisano kilka alternatywnych dla krwi próbek biologicznych, wykorzystywanych w diagnostyce laboratoryjnej czy też monitoringu stanu zdrowia świń. Przykłady stanowią płyn ustny (ang. *oral fluid*, OF) oraz MJ. Oba rodzaje materiałów okazały się przydatne do wykrywania swoistych przeciwciał przeciwko ważnym patogenom świń (Molina i wsp., 2008; Wachek i wsp., 2012; Bjstrom-Kraft i wsp., 2018; Poonsuk i wsp., 2018; Carella i wsp., 2023), jednakże ich przydatność w stosunku do oceny statusu immunologicznego prosiąt jest wątpliwa. W obu przypadkach jest to wynikiem sposobu pobierania danej próbki. MJ uzyskuje się poprzez kilkukrotne rozmrażanie fragmentu pobranej tkanki mięśniowej, w związku z czym MJ jest najczęściej pobierany poubojowo, w rzeźni (Turelwich-Podbielska i wsp., 2020). OF może być pobierany na dwa sposoby, jako próbka indywidualna lub próbka zbiorcza, przy czym w praktyce, najczęściej wykorzystuje się drugą z metod. Pobranie OF, w formie próbki zbiorczej, polega na zawieszaniu w kojcu sznura, najczęściej bawełnianego, i pozwolenie świniom na swobodne jego przeżuwanie. Po upływie około 20 minut, ze sznura można pozyskać wystarczającą do celów diagnostycznych objętość OF (Fablet i wsp., 2017; Turlewicz-Podbielska i wsp., 2020). W przypadku prosiąt metoda ta zdaje się być nieefektywna, gdyż prosięta nie wykazują takiego zainteresowania sznurem, jak starsze świny, podobnie zmniejszone zainteresowanie żuciem swobodnie zainstalowanego w obrębie kojca sznurka do pobierania OF zaobserwowano u loch (Fablet i wsp., 2017; Turlewicz-Podbielska i wsp., 2020). Dostępne badania wskazują, że poprawę efektywności pobierania OF można uzyskać poprzez odpowiedni trening zwierząt w tym zakresie (Tarasiuk i wsp., 2024). Dużo bardziej obiecującym rodzajem materiału, który mógłby ułatwić przeprowadzanie wczesnej oceny statusu immunologicznego prosiąt jest płyn technologiczny (ang. *processing fluid*, PF).

4.2.1. Płyn technologiczny

PF jest najczęściej otrzymywany z ogonów i jąder prosiąt pozyskanych w skutek przeprowadzonych zabiegów skracania ogonów i kastracji. Skracanie ogonów jest zabiegiem mającym na celu zapobieganie stereotypii jaką jest kanibalizm, natomiast zadaniem kastracji jest głównie eliminacja zapachu płciowego samca z produktów mięsnych, za którego powstawanie odpowiadają wytwarzane w organizmie niekastrowanych samców i kumulowane w tkance tłuszczowej po osiągnięciu dojrzałości płciowej hormony – androsteron, skatol i indol (Duarte i wsp., 2021). Procedura pozyskiwania PF w terenie polega najczęściej na umieszczeniu w pojemniku (np. wiadro) worka foliowego, w którym dodatkowo umieszcza się gazę (Lopez i wsp., 2018). Obcięte ogony oraz usunięte jądra umieszcza się w tak przygotowanym pojemniku, pozwalając, by płyn wyciekający z tkanek gromadził się między gazą a folią. Otrzymaną w ten sposób próbkę PF zlewa się następnie z worka foliowego do probówki, a pozostałe tkanki poddaje utylizacji (Lopez i wsp., 2018). Ponieważ obcinanie ogonów oraz kastracja są zabiegami, które wciąż są wykonywane na wielu fermach na świecie, wydaje się, że PF może być obiecującą alternatywą dla krwi w przypadku wielu badań diagnostycznych, w tym przy ocenie wczesnego statusu immunologicznego świń. Pozyskiwanie PF nie wiąże się z generowaniem dodatkowych kosztów, nakładów pracy, czy też stresu dla zwierząt. Aktualnie, pewne ograniczenia w pozyskiwaniu tego typu materiału mogą dotyczyć głównie krajów należących do Unii Europejskiej (ang. *European Union*, EU) lub innych krajów Europy zachodniej niezrzeszonych w EU. Wynika to z faktu, że w państwach tych w hodowli zwierząt gospodarskich bardzo istotne są kwestie związane z dobrostanem. Efektem takiego podejścia jest m. in. Dyrektywa Rady 2008/120/WE z dnia 18 grudnia 2008 r. ustanawiająca minimalne normy ochrony świń. Zgodnie z przywołanym aktem prawnym, zabieg obcinania ogonów nie może być przeprowadzany rutynowo. Procedura obcinania ogonów może zostać w danym gospodarstwie wdrożona tylko i wyłącznie w wyjątkowych sytuacjach, gdy zaobserwowano pierwsze objawy stereotypii oraz gdy inne działania podjęte w celu zapobiegania okaleczaniu świń, po przeprowadzeniu dogłębnej analizy ryzyka, jak np. modyfikacja warunków utrzymania, nie przyniosły oczekiwanego rezultatu. Zgodnie z Dyrektywą 2008/120/WE kastracja chirurgiczna bez stosowania znieczulenia na ternie EU jest dopuszczalna w przypadku knurków do 7 dnia życia. W 2010 roku Komisja Europejska oraz Belgia, która pełniła wówczas prezydencję w Radzie EU, wyszły z inicjatywą ustanowienia „Europejskiej Deklaracji na rzecz alternatyw dla kastracji

chirurgicznej” (De Briyne i wsp., 2016). Sygnatariuszami tego dokumentu są stowarzyszenia i organizacje zrzeszające m.in. hodowców, producentów wieprzowiny i lekarzy weterynarii. Celem było odejście od przeprowadzania kastracji chirurgicznej knurków bez znieczulenia do 2012 oraz całkowita rezygnacja z kastracji chirurgicznej knurków na terenie krajów zrzeszonych w EU i Europejskim Stowarzyszeniu Wolnego Handlu (ang. *European Free Trade Association*, EFTA) do 2018 roku (De Briyne i wsp., 2016). W świetle powyższego, na terenie poszczególnych krajów członkowskich, zaczęto rezygnować z przeprowadzania zabiegu kastracji chirurgicznej na rzecz metod alternatywnych, takich jak produkcja świń niekastrowanych lub immunokastracja (De Briyne i wsp., 2016). Dostępne dane wskazują jednak, że cel niniejszej Deklaracji nie został osiągnięty, jako, że w większości krajów członkowskich kastracja chirurgiczna pozostała dominującą metodą ograniczania występowania zapachu płciowego w mięsie knurów (De Briyne i wsp., 2016; Backus i wsp., 2018). We wnioskach z „Drugiego raportu o postępach w sprawie Europejskiej Deklaracji na rzecz alternatyw dla kastracji chirurgicznej” możemy przeczytać, że postęp w omawianym zakresie nie przebiegał zgodnie z terminarzem i zakresem przyjętym w momencie podpisywania Deklaracji (Backus i wsp., 2018). Wskazano, że brakowało zasobów na szybszą realizację celów Deklaracji oraz, że na poziomie unijnym rynek nie wydawał się być gotowy na transformację (Backus i wsp., 2018). W 2020 roku 31.5% świń poddawanych ubojowi w EU stanowiły kastrowane samce, 17% niekastrowane samce, a 1% samce poddane immunokastracji (IFIP Institut du porc, 2022). Należy podkreślić, że sytuacja w zakresie omawianych praktyk w poszczególnych krajach europejskich jest zróżnicowana, a obowiązujące przepisy nie są zharmonizowane. Hodowla niekastrowanych samców jest dominującą metodą produkcji w państwach, które mają silne tradycje związane z tą praktyką jak Hiszpania, Portugalia, Wielka Brytania oraz Irlandia (De Briyne i wsp., 2016). Od czasu wejścia w życie „Europejskiej Deklaracji na rzecz alternatyw dla kastracji chirurgicznej” zaobserwowano wzrost odsetka samców hodowanych w ten sposób także w innych spośród krajów członkowskich, jednakże jedynie w Holandii ten sposób redukcji płciowego zapachu w mięsie stał się metodą dominującą (De Briyne i wsp., 2016). Może wynikać to z faktu, że utrzymywanie niekastrowanych samców generuje pewne problemy, takie jak wzrost poziomu agresywności czy wykazywanie zachowań płciowych w stosunku do pozostałych zwierząt (Weiler i wsp., 2021). Ponadto, może negatywnie wpływać na jakość mięsa pozyskiwanego od takiego osobnika, nie tylko poprzez wyczuwalny zapach płciowy, ale też przez mniejszą zawartość tłuszczu

(Weiler i wsp., 2021). Proponowane rozwiązania kwestii zapachu płciowego u niekastrowanych samców obejmują m.in. ubój samców przed osiągnięciem dojrzałości płciowej lub selekcję w kierunku braku zapachu płciowego, jednakże podejścia te wiążą się m.in. z kosztami (Federations of Veterina, 2019; Duarte i wsp., 2021; Weiler i wsp., 2021). W przypadku immunokastracji, jedynym krajem europejskim, w którym znalazła ona szersze zastosowanie jest Belgia, jednakże i w tym kraju, dominującą metodą eliminacji płciowego zapachu pozostaje kastracja chirurgiczna (De Briyne i wsp., 2016). Inne kraje, jak Norwegia, Dania, Szwajcaria, Szwecja, Niemcy oraz Francja wprowadziły regulacje prawne nakazujące obligatoryjne stosowanie anestezji i/lub analgezji przy wykonywaniu kastracji chirurgicznej knurków (De Bryne i wsp., 2016; Tierschutzgesetz; Arrêté du 17 novembre 2020). Natomiast w pozostałych państwach europejskich, m.in. w Polsce, dominującą metodą zapobiegania występowania zapachu płciowego mięsa wieprzowego pozostaje w dalszym ciągu kastracja chirurgiczna do 7 dnia życia prosiąt bez znieczulenia (De Briyne i wsp., 2016). Co istotne, w pozostałych krajach niebędących członkami EU czy EFTA, stanowiących istotnych światowych producentów wieprzowiny, jak m.in. Chiny, Stany Zjednoczone, czy Brazylia, powyższe kwestie związane z kastracją chirurgiczną i obcinaniem ogonów nie są aktualnie nawet przedmiotem żadnej większej debaty. Można zatem zakładać, że pozyskiwanie PF będzie w perspektywie najbliższych lat w dalszym ciągu możliwe.

PF jako potencjalnie przydatny materiał do diagnostyki laboratoryjnej został po raz pierwszy opisany w 2010 (Boettcher i wsp., 2010). W porównaniu do pozostałych typów próbek pobieranych od świń jego przydatność do celów diagnostycznych jest poznana w mniejszym stopniu. Dostępne dane wskazują na jego przydatność do monitorowania wybranych patogenów świń (Boettcher i wsp., 2010; Lopez i wsp., 2018; Trevisan i wsp., 2019; Fan i wsp., 2023). Najwięcej uwagi w tym zakresie poświęcono wirusowi zespołu rozrodzo oddechowego świń (ang. *porcine respiratory and reproductive syndrome virus*, PRRSV). Przydatność PF do monitoringu PRRSV została po raz pierwszy opisana w 2018 (Lopez i wsp., 2018) i następnie była potwierdzana przez wyniki kolejnych badań (Vilalta i wsp., 2018; Trevisan i wsp., 2019; Turlewicz-Podbielska i wsp., 2025). Według jednego z autorów prawdopodobieństwo wykrycia RNA PRRSV w PF było wyższe w porównaniu do odpowiadających zbiorczych próbek surowicy (Lopez i wsp., 2018). Aktualnie PF jest coraz częściej wykorzystywany do monitorowania PRRS w stadach hodowlanych, jako, że przy zachowaniu odpowiednich

procedur, umożliwia przeprowadzanie wiarygodnych analiz przy jednocześnie niższym nakładzie pracy i kosztów niż w przypadku wykorzystywania do monitoringu próbek surowicy (Lopez i wsp., 2020). Dostępne wyliczenia wskazują, że zastąpienie indywidualnych próbek surowicy próbkami PF w monitoringu PRRSV obejmującym przebadanie 100% stawki rodzących się prosiąt w stadzie PRRS stabilnym, liczącym 5000 loch, w którym tygodniowo prosi się około 235 loch pozwoliłoby na zminimalizowanie kosztów takiego monitoringu z 750 000 dolarów do 13 000 dolarów w skali roku (Lopez i wsp., 2020). Dowiedziono także, że materiał genetyczny PRRSV zawarty w PF, przechowywany w temperaturach -20°C oraz 4°C wykazuje się wysoką stabilnością (Lopez i wsp., 2022). Dostępne dane wskazują na przydatność PF do monitorowania także innych patogenów, jak m.in. cirkowirus świń typu 2, w odniesieniu do którego, zauważono, że PF może być bardziej miarodajny niż surowica (Fan i wsp., 2023). Większość z przeprowadzonych badań oceniała przydatność PF do wykrywania materiału genetycznego patogenów za pomocą różnych technik reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polimerase chain reaction*, PCR). Oprócz tego, PF może służyć do wykrywania specyficznych przeciwciał, co potwierdzają badania nad występowaniem w PF przeciwciał skierowanych przeciwko m.in. PRRSV (Lopez i wsp., 2018; Lopez i wsp., 2022, Turlewicz-Podbielska i wsp., 2025). Biorąc pod uwagę powyższe, PF stanowi praktyczny i niedrogi materiał diagnostyczny, który potencjalnie może usprawnić także inne obszary diagnostyki i monitoringu zdrowia świń. Według Turlewicz-Podbielskiej i wsp., (2025) ważne jest jednak, aby zdawać sobie sprawę z potencjalnych negatywnych konsekwencji bezkrytycznego pulowania próbek PF.

Jedną z najczęściej wykorzystywanych we współczesnej diagnostyce i monitoringu zdrowia świń metod diagnostycznych jest test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Istnieje kilka odmian tego testu (bezpośredni, pośredni, podwójnego wiązania, kompetencyjny), jednakże każda z nich wykorzystuje zjawisko interakcji pomiędzy antygenem i przeciwciałem. Może być zatem wykorzystywany do oceniania różnych komponentów, wliczając w to przeciwciała, cytokiny, czy APP. Test ten może być zarówno jakościowy, co pozwala na wykrywanie obecności analizowanego komponentu w próbce, jak i ilościowy, co pozwala na precyzyjne określenie jego stężenia. Dostępnych jest wiele komercyjnych testów ELISA przeznaczonych do diagnostyki i monitoringu zdrowia świń, jednakże większość z nich

jest walidowana jedynie dla najpowszechniej wykorzystywanego rodzaju materiału jakim jest surowica.

Biorąc pod uwagę zapisy Dyrektywy Rady 2008/120/WE z dnia 18 grudnia 2008 r. ustanawiającej minimalne normy ochrony świń w aspekcie wskazań do skracania ogonów oraz fakt, iż dotychczas w światowym piśmiennictwie brakuje informacji na temat przydatności diagnostycznej PF pozyskanego wyłącznie z jąder, w dalszych badaniach skupiliśmy się na ocenie możliwości diagnostycznego wykorzystania właśnie tego rodzaju próbek. Ponadto, dotychczas brak jest danych na temat przydatności PF do oceny stężeń parametrów immunologicznych (immunoglobuliny, cytokiny, APP) u prosiąt ssących oraz pośrednio ich matek. Brakuje także informacji na temat możliwości wykorzystania tej próbki do badań nad oceną występowania u prosiąt swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko wielu istotnym patogenom świń. Z uwagi na fakt, że w większości badań dotyczących potencjalnego wykorzystania PF do celów diagnostycznych, analizowano PF jako próbkę zbiorczą, a niewiele jest prac badających konsekwencje łączenia indywidulanych próbek PF (tzw. pulowanie próbek) na uzyskiwane wyniki, postanowiliśmy ocenić także możliwości oraz konsekwencje pulowania próbek PF w aspekcie prawidłowej interpretacji sytuacji epidemiologicznej w stadzie.

5. Hipoteza i cel badań

Na podstawie danych literaturowych oraz badań pilotażowych sformułowano następujące hipotezy badawcze:

1. PF pozyskany wyłącznie z jąder stanowi alternatywę dla surowicy do oceny stężeń wybranych parametrów immunologicznych u świń (immunoglobuliny, cytokiny, APP).
2. PF pozyskany wyłącznie z jąder stanowi alternatywę dla surowicy do wykrywania obecności swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko wybranym patogenom świń.
3. Komercyjne testy ELISA opracowane i walidowane dla surowicy mogą być wykorzystywane do oceny stężeń parametrów immunologicznych oraz wykrywania swoistych przeciwciał w PF.
4. Łączenie indywidualnych próbek PF (tzw. pulowanie próbek) i badanie jako próbki zbiorcze nie wpływa na uzyskane wyniki.

Celem badań było określenie przydatności PF do oceny stężeń wybranych parametrów immunologicznych (Ig - IgG, IgM, IgA; cytokiny – IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α ; APP – Hp, Pig-MAP, CRP, SAA) oraz wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko wybranym patogenom świń: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Ery), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp), wirusowi grypy typu A (ang. *influenza A virus*, IAV), wirusowi zapalenia wątroby typu E (ang. *hepatitis E virus*, HEV) oraz wirusowi epidemicznej biegunki świń (ang. *porcine epidemic diarrhoea virus*, PEDV). Ponadto przeanalizowano możliwość wykorzystania PF do oceny statusu immunologicznego całego miotu oraz pośrednio loch – matek badanych knurków. Dodatkowo określona została użyteczność komercyjnie dostępnych testów ELISA opracowanych i walidowanych dla surowicy do wykrywania i/lub oceny stężeń badanych parametrów immunologicznych i przeciwciał swoistych w PF. Oceniony został także wpływ pulowania indywidulanych próbek PF na uzyskiwane wyniki.

6. Materiał i metody

W celu weryfikacji postawionych hipotez przeprowadzono dwa eksperymenty z wykorzystaniem materiału biologicznego pozyskanego od świń. Z uwagi na to, że próbki wykorzystane do badań były pobierane w ramach rutynowych czynności lekarsko-weterynaryjnych (diagnostyka, monitoring zdrowia i ocena statusu immunologicznego) przez lekarzy weterynarii opiekujących się stadami oraz rutynowych zabiegów hodowlanych (kastracja), zgoda Lokalnej Komisji Etycznej na przeprowadzenie omawianych eksperymentów nie była wymagana (Uchwała LKE w Poznaniu nr 67/2020 z dnia 18.12.2020).

W eksperymencie I oceniona została przydatność PF do oceny stężeń wybranych parametrów immunologicznych u prosiąt ssących oraz ich matek. W celu określenia przydatności PF do oceny stężeń badanych parametrów u prosiąt oraz możliwości wykorzystania uzyskanych wyników do oceny statusu immunologicznego całego miotu (bez względu na płć), oceniono różnice pomiędzy stężeniami badanych parametrów w surowicy knurków i loszek oraz pomiędzy surowicami prosiąt obu płci i PF. Analiza przydatności PF do oceny statusu immunologicznego loch została przeprowadzona poprzez zbadanie korelacji pomiędzy stężeniami analizowanych parametrów we wszystkich wykorzystanych próbkach (surowica, siara, PF).

Celem eksperymentu II było określenie przydatności PF do wykrywania przeciwciał swoistych dla wybranych patogenów świń z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych testów ELISA walidowanych dla surowicy. W tym celu, oceniono różnice w odsetku poszczególnych typów próbek (surowica knurków, loszek, PF) zaklasyfikowanych jako dodatnie w oparciu o punkt odcięcia (ang. *cut-off*) rekomendowany przez producenta testu (surowica, PF) oraz optymalny punkt odcięcia (ang. *optimal threshold*, OT) dla PF obliczony dla każdego testu przy pomocy analizy krzywej charakterystyki operacyjnej odbiornika (ang. *receiver operating characteristic curve*, ROC). Określono także podstawowe parametry walidacyjne każdego użytego w badaniach testu w odniesieniu do próbek PF (interpretowanych według obu punktów odcięcia). W dalszej części eksperymentu oceniono wpływ pulowania próbek PF na uzyskane wyniki.

6.1. Eksperyment 1

6.1.1. Próbkki

Próbki wykorzystane w doświadczeniu zostały pobrane od świń z gospodarstwa odchowującego świnię w cyklu zamkniętym, liczącym 100 loch, rasy Danbred hybrid. Grupy 9-10 loch były tworzone co 21 dni. Na fermie między 3 a 5 dniem życia prosiąt przeprowadzano kastrację, natomiast nie stosowano przemieszczania prosiąt między miotami. Lochy z prosiętami były utrzymywane w dobrze przygotowanych do tego celu kojach porodowych. Na fermie obowiązywał system całe pomieszczenie pełne – całe pomieszczenie puste, z przeprowadzeniem dokładnej dezynfekcji pomieszczeń pomiędzy poszczególnymi grupami prośnych loch. Prosięta były odsadzane około 28 dnia życia.

Ferma charakteryzowała się wysokim statusem zdrowotnym. Przyjęty program monitorowania stanu zdrowia stada obejmował prowadzenie badań monitoringowych opartych o profile serologiczne prowadzone we wszystkich grupach technologicznych (w tym u prosiąt) oraz okresowo ocenę jakości siary. Na podstawie wyników cyklicznie przeprowadzanych badań, stwierdzono, że stado jest seronegatywne w odniesieniu do takich patogenów jak wirus choroby Aujeszkyego, PRRSV, IAV, App oraz Mhp. W trakcie badań klinicznych i anatomopatologicznych, przeprowadzanych okresowo w rzeźni, nie stwierdzano żadnych zmian wskazujących na występowanie pleuropnemonii, sterptokokoz, choroby Glässera, czy zakaźnego zanikowego zapalenia nosa. Wszystkie lochy były szczepione przeciwko parwowirozie świń, różycy, zakaźnemu zanikowemu zapaleniu nosa oraz kolibakteriozie prosiąt. Na potrzeby

niniejszego eksperymentu wykorzystano próbki pochodzące wyłącznie z miotów loch między 2-4 wyproszeniem, ważących między 150-200 kg, które rodziły w miocie minimum 10 prosiąt i nie wymagały pomocy porodowej.

W badaniu wykorzystano łącznie próbki od 246 świń – 31 loch, 146 knurków i 87 loszek. Warunkiem włączenia próbek do badań było uzyskanie wszystkich niezbędnych próbek od lochy oraz minimum 7 jej prosiąt. Dla każdej z loch włączonych do badań analizowano po jednej próbce surowicy i siary, pobranej 12-24 godziny od rozpoczęcia porodu. Dla każdego knurka włączonego do badań analizowano jedną próbkę surowicy i jedną próbkę PF, natomiast dla każdej loszki jedną próbkę surowicy. Łącznie analizom laboratoryjnym poddano 31 próbek siary, 31 surowic loch, 146 surowic knurków, 146 PF oraz 87 surowic od loszek. Krew była pobierana przez lekarza weterynarii z żyły szyjnej zewnętrznej (łac. *vena jugularis*) lub z żyły czołowej przedniej (łac. *vena cava cranialis*) do probówek dedykowanych dla tego materiału. Następnie, w celu uzyskania surowicy, krew odwirowano (2500 obrotów/minutę przez 15 minut w 4°C). PF wykorzystany w doświadczeniu był uzyskiwany wyłącznie z jąder, poprzez umieszczenie jąder od każdego knurka w indywidualnej probówce o pojemności 50 ml, następnie jej zamrożenie i rozmrożenie i pobranie uwolnionego przez tkanki płynu. Wszystkie rodzaje próbek były przechowywane w temperaturze -80°C do czasu analiz laboratoryjnych.

6.1.2. Analizy laboratoryjne

Do określenia stężeń badanych parametrów wykorzystano komercyjne, gatunkowo swoiste, ilościowe testy ELISA. Wszystkie analizy były przeprowadzane zgodnie z metodykami dołączonymi do zestawów. Wartości gęstości optycznej (ang. *optical density*, OD) analizowanych próbek zostały odczytane za pomocą analizatora Infinite 200 PRO (Tecan). Stężenia badanych parametrów wyliczono z krzywej standardowej, opracowanej dla każdej badanej partii próbek (96 dołkowa płytka) z wykorzystaniem oprogramowania Magellan v.7.2 (Tecan). W Tabeli 1 zawarto informacje dotyczące specyfikacji testów użytych do określania stężeń parametrów uwzględnionych w niniejszym eksperymencie.

Tabela 1. Wybrane dane dotyczące komercyjnych testów ELISA wykorzystanych w eksperymencie.

Badany parametr		Nazwa testu (producent)	Granica wykrywalności
Immunoglobuliny	IgG	<i>Porcine Immunoglobulin G, IgG ELISA Kit</i> (BT Laboratory, Jiaxing, Zhejiang, Chiny)	0,251 mg/ml
	IgA	<i>Porcine Immunoglobulin A, IgA ELISA Kit</i> (BT Laboratory, Jiaxing, Zhejiang, Chiny)	10,25 µg/ml
	IgM	<i>Porcine Immunoglobulin M, IgM ELISA Kit</i> (BT Laboratory, Jiaxing, Zhejiang, Chiny)	0,022 mg/ml
Cytokiny	IL-1 β	<i>Ray-Bio® Porcine IL-1 beta ELISA Kit</i> (RayBiotch Inc., Norcross, GA, USA)	6 pg/ml
	IL-4	<i>RayBio® Porcine IL-4 ELISA Kit</i> (RayBiotch Inc., Norcross, GA, USA)	1,5 pg/ml
	IL-6	<i>RayBio® Porcine IL-6 ELISA Kit</i> (RayBiotch Inc., Norcross, GA, USA)	45 pg/ml
	IL-8	<i>RayBio® Porcine IL-8 ELISA Kit</i> (RayBiotch Inc., Norcross, GA, USA)	10 pg/ml
	IFN- γ	<i>RayBio® Porcine IFN-gamma ELISA Kit</i> (RayBiotch Inc., Norcross, GA, USA)	500 pg/ml
	TNF- α	<i>RayBio® Porcine TNF-alpha ELISA</i> (RayBiotch Inc., Norcross, GA, USA)	20 pg/ml
APP	CRP	<i>Pig C-reactive protein (CRP) ELISA</i> (Life Diagnostics Inc., West Chester, PA, USA)	4,68 µg/ml
	Hp	<i>Pig haptoglobin ELISA</i> (Life Diagnostics Inc., West Chester, PA, USA)	0,05 mg/ml
	SAA	<i>Pig serum amyloid A ELISA, Pighaptoglobin ELISA</i> (Life Diagnostics Inc., West Chester, PA, USA)	0,31 µg/ml
	Pig-MAP	<i>Acuvet ELISA PigMAP</i> (AcuvetBiotech SL, Zaragoza, Spain)	0,18 µg/ml

Wykorzystane w doświadczeniu testy ELISA były walidowane przez producentów w odniesieniu do surowicy. Dlatego, w celu zapewnienia precyzji wyników, wszystkie próbki zostały zbadane dwukrotnie, a wyniki były uznawane za akceptowalne w sytuacji, gdy względne odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*, SD) wynosiło $\leq 10\%$. Ponadto, dla każdego wykorzystanego testu określono powtarzalność oraz odtwarzalność w odniesieniu do próbek siary i PF, wyrażane jako współczynnik zmienności (ang. *coefficient of variation*, CV). Przy określaniu tych parametrów uwzględnione zostały próbki siary i PF, w których stężenia ocenianych parametrów osiągały trzy różne pułapy – próbki negatywne, o niskim i wysokim stężeniu badanych parametrów. Otrzymane wartości nie przekraczały w przypadku powtarzalności 9,5% oraz 11,5% w przypadku odtwarzalności. Dokładność testów została zbadana za pomocą liniowości rozcieńczeń. W tym celu wykonano szereg rozcieńczeń (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) 2 próbek PF i siary i zbadano odpowiednimi testami ELISA. W wyniku przeprowadzonych analiz otrzymano równania regresji liniowej ze współczynnikiem korelacji w zakresach 0,97-0,99, co wskazywało na to, że testy mierzyły parametry w sposób liniowy.

6.1.3. Analizy statystyczne

Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone z wykorzystaniem oprogramowania Statistica 13.3 (Tibco). Otrzymane dane zostały przeanalizowane za pomocą testów W.Shapiro-Wilk'a na normalność rozkładu oraz Levene'a na równość wariancji. W celu określenia, czy PF pozyskiwany wyłącznie z jąder może być wykorzystywany do oceny badanych parametrów u prosiąt obu płci zbadano różnice w średnich stężeniach poszczególnych parametrów pomiędzy PF a surowicą knurków, PF a surowicą loszek oraz surowicami prosiąt obu płci, z wykorzystaniem nieparametrycznego testu U Mann'a-Whitney'a. W celu zbadania czy pomiędzy stężeniami wybranych parametrów w różnych typach analizowanego materiału występuje zależność, oceniono stopień korelacji stężeń każdego analizowanego parametru pomiędzy następującymi parami próbek: surowica lochy i surowica knurka, surowica lochy i PF, surowica lochy i surowica loszki, siara i surowica knurka, siara i PF, siara i surowica loszki. Z uwagi na nieparametryczny rozkład analizowanych zmiennych, do określenia korelacji w stężeniach wybranych parametrów pomiędzy poszczególnymi rodzajami badanego materiału wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearman'a (ang. *Spearman's rank correlation coefficient*, r_s). Klasyfikacji siły zaobserwowanego

związku dokonano w oparciu o następujący podział: $|r_s| < 0,2$ – brak związku liniowego, $0,2 \leq |r_s| < 0,4$ – słaba zależność, $0,4 \leq |r_s| < 0,7$ – umiarkowana zależność, $0,7 \leq |r_s| < 0,9$ – silna zależność, $|r_s| \geq 0,9$ – bardzo silna zależność. Dla wszystkich analiz przyjęty poziom istotności wynosił $\alpha=0,05$, a za istotne statystycznie wartości uznawano $p<0,05$.

6.2. Eksperyment 2

6.2.1. Próbkki

W doświadczeniu drugim wykorzystane zostały próbki krwi i PF pozyskane od prosiąt w wieku do 7 dnia życia. Wykaz próbek przebadanych w poszczególnych kierunkach przedstawiono w Tabeli 2. Krew była pobierana przez lekarza weterynarii z żyły czołowej przedniej (łac. *vena cava cranialis*) do probówek dedykowanych dla tego materiału. W celu uzyskania surowicy krew była wirowana przez 15 minut, z szybkością 2500 obrotów/minutę, w temperaturze 4°C. W celu uzyskania próbek PF, jądra pozyskane od knurków podczas rutynowej kastracji stosowanej w gospodarstwie były umieszczane w indywidualnej probówce o pojemności 50 ml, zamrażane i następnie rozmrażane celem uzyskania większej objętości płynu. Do czasu przeprowadzania analiz laboratoryjnych wszystkie próbki były przechowywane w temperaturze -80°C.

6.2.2. Analizy laboratoryjne

Do badań wykorzystano komercyjne testy ELISA dedykowane do badań surowicy i walidowane dla tego materiału. W surowicy oraz PF oceniono obecność swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko wybranym patogenom świń. W Tabeli 2 zaprezentowano szczegółowe dane dotyczące testów użytych w badaniach oraz liczbę próbek, która została przeanalizowana danym testem. Wszystkie analizy były przeprowadzane zgodnie z rekomendacjami producentów dołączonymi do testów. OD została zmierzona z wykorzystaniem czytnika Infinite 200 PRO (Tecan) i oprogramowania Magellan v.7.2 (Tecan), a wyniki obliczono zgodnie z metodyką dołączoną do zestawów. W przypadku testów w kierunku App i PEDV, wartości OD były przekształcane we współczynnik S/P (ang. *serum to positive*) % zgodnie z następującym wzorem: $S/P\% = (OD \text{ próbki} - OD \text{ kontroli negatywnych}) / (OD \text{ kontroli pozytywnych} - OD \text{ kontroli negatywnych}) \times 100$. W przypadku testu w kierunku Mhp, wartości OD zostały przekształcone we współczynnik S/P zgodnie z następującym wzorem: $S/P = (OD \text{ próbki} - OD \text{ kontroli negatywnych}) / (OD \text{ kontroli pozytywnych} - OD \text{ kontroli negatywnych})$. W teście w kierunku Ery wartości OD zostały przekształcone w IRPC

(ang. *relative index positive to control*) według następującego wzoru: $IRPC = ((OD \text{ próbki} - OD \text{ kontroli negatywnych}) / (OD \text{ kontroli pozytywnych} - OD \text{ kontroli negatywnych})) \times 100$. Test w kierunku HEV, był testem typu *bi-well*, co oznacza, że każda z analizowanych próbek musiała zostać nałożona do dwóch dołków na płytce. Dla każdej z analizowanych prób obliczano wartość net OD, odejmując od wartości OD próbki nałożonej do dołka parzystego, wartość OD z dołka nieparzystego. Następnie, uzyskane wartości OD były przekształcane we współczynnik S/P% zgodnie z następującym wzorem: $S/P\% = \text{net OD próbki} / \text{net OD kontroli pozytywnych} \times 100\%$. W przypadku testu w kierunku IAV, uzyskane wartości OD były przekształcane we współczynnik S/N (ang. *sample to negative*) %, zgodnie z następującym wzorem: $S/N\% = OD \text{ próbki} / OD \text{ kontroli negatywnych} \times 100$.

Tabela 2. Wykaz testów wykorzystanych w badaniach wraz z liczbą próbek przebadanych w poszczególnych kierunkach.

Kierunek badania	Nazwa użytego testu (producent)	Liczba próbek poddanych analizie			
		Surowica knurek	Surowica loszka	PF	Łącznie
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (App)	<i>ID Screen APP Screening Indirect (serotypes 1 through 12)</i> (ID vet, Grables, France)	178	159	178	515
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (Ery)	<i>Civtest suis SE/MR</i> (Hipra, Amer, Spain)	160	154	160	474
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (Mhp)	<i>Mycoplasma hyopneumoniae Antibody Test Kit</i> (Idexx, Westbrook, USA)	196	209	196	601
Wirus zapalenia wąroby typu E (HEV)	<i>ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species</i> (ID vet, Grables, France)	160	144	160	464
Wirus grypy typu A (IAV)	<i>ID Screen Influenza A Antibody Competition Multi-Species</i> (ID vet, Grables, France)	160	163	160	483
Wirus epidemicznej biegunki świń (PEDV)	<i>ID Screen PEDV Indirect</i> (ID vet, Grables, France)	160	146	160	466

W dalszej kolejności, oceniono wpływ pulowania próbek PF na otrzymane wyniki. W tym celu, na podstawie uzyskanych wartości dokonano kategoryzacji próbek na nisko-, średnio- i wysoko-dodatnie. Zakres poszczególnych kategorii podano w Tabeli 3. Spośród dodatnich próbek PF, do każdej z grup zaklasyfikowano po 3 losowo wybrane próbki. Następnie, pobierano 10 µl z każdej dodatniej próbki i łączono z odpowiednią objętością negatywnej próbki PF, otrzymując rozcieńczenia w stosunku 1:10, 1:20, 1:40 oraz 1:80. Miało to na celu symulację pulowania w próbkę zbiorczą, w której to na

1 dodatnią próbkę PF znajdującą się w badanej puli, przypadało by odpowiednio 9, 19, 39 i 79 próbek ujemnych.

Tabela 3. Zakresy kwalifikacji próbek dodatnich do grup o niskim, średnim i wysokim wyniku dodatnim w zależności od zastosowanego testu.

Kierunek badania	Zakres	Nisko-dodatnie	Średnio-dodatnie	Wysoko-dodatnie
App	S/P%	≤ 70	$>70 \leq 180$	>180
Ery	IRPC	≤ 60	$>60 \leq 100$	>100
Mhp	S/P	$\geq 1,0$	$<1,0 \geq 0,5$	$<0,5$
HEV	S/P%	<100	$\geq 100 <150$	≥ 150
IAV	S/N%	≥ 40	$<40 \geq 15$	<15
PEDV	S/P%	nie przeprowadzano analizy ¹		

¹Z uwagi na małą liczbę próbek dodatnich, niemożliwe było dokonanie podziału uwzględniającego różną zawartość przeciwciał w PF, dlatego w przypadku tego testu nie przeprowadzono analizy wpływu rozcieńczeń na wykrywanie specyficznych przeciwciał w próbkach zbiorczych PF.

6.2.3. Analiza statystyczna

Wyniki analiz uzyskane z surowic stanowiły w niniejszym eksperymencie punkt odniesienia (tzw. *gold-standard*). Dla każdego badanego rodzaju materiału obliczono odsetek próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie. 95% przedziały ufności (ang. *confidence interval*, CI) zostały obliczone za pomocą metody Wilsona (ang. *Wilson score method*). W celu oceny różnic w odsetku próbek dodatnich pomiędzy poszczególnymi rodzajami materiałów (surowica knurków, surowica loszek, PF), wykorzystano test chi kwadrat. Powyższe analizy zostały przeprowadzone przy pomocy oprogramowania Statistica 13.3 (Tibco). Za pomocą krzywych ROC obliczono OT dla PF i zastosowanych testów ELISA. Przeanalizowano i porównano pola powierzchni pod krzywą (ang. *area under the curve*, AUC) dla surowicy i PF, co pozwoliło na ustalenie mocy diagnostycznej testu w odniesieniu do próbek PF. Otrzymane wartości zostały zaklasyfikowane do 5 grup, tak jak przedstawiono w Tabeli 4, zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Çorbacioğlu i Aksel (2023). Dla każdego z testów obliczono: czułość (ang. *sensitivity*, SE), swoistość (ang. *specificity*, SP), dodatnią (ang. *positive predictive value*, PPV) i ujemną (ang. *negative predictive value*, NPV) wartość

predykcyjna dla PF w odniesieniu do punktu odcięcia rekomendowanego przez producenta oraz OT wyznaczonego na podstawie krzywej ROC. Zgodność pomiędzy wynikami uzyskanymi z analizy próbek surowicy i PF została określona z wykorzystaniem współczynnika kappa (κ), według klasyfikacji zaproponowanej przez Landis i Koch (1977): $\kappa < 0,2$ oznaczała słabą zgodność, 0,2-0,4 dostateczną zgodność, 0,41-0,6 umiarkowaną zgodność, 0,61-0,8 znaczną zgodność, natomiast $\kappa > 0,8$ – doskonałą zgodność. W przypadku wszystkich analiz, wartości $p < 0,05$ były uznawane za istotne statystycznie.

Tabela 4. Klasyfikacja dokładności testu w odniesieniu do PF w zależności od uzyskanej wartości AUC.

Przedział AUC	Miara dokładności testu
$0,9 \leq \text{AUC}$	Doskonała
$0,8 \leq \text{AUC} < 0,9$	Znaczna
$0,7 \leq \text{AUC} < 0,8$	Dostateczna
$0,6 \leq \text{AUC} < 0,7$	Słaba
$0,5 \leq \text{AUC} < 0,6$	Niewystarczająca

7. Wyniki

7.1. Eksperyment 1

Poniżej przedstawiono wyniki badań zawarte w artykule:

Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Concentrations of selected immunological parameters in the serum and processing fluid of suckling piglets and the serum and colostrum of their mothers. BMC Veterinary Research. 2024, 20:170.

Spośród ocenianych parametrów immunologicznych, wartości powyżej granicy wykrywalności w PF zostały odnotowane w przypadku analiz IgG, IgA, IgM, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ , Hp, Pig-MAP i CRP, potwierdzając ich występowanie w PF.

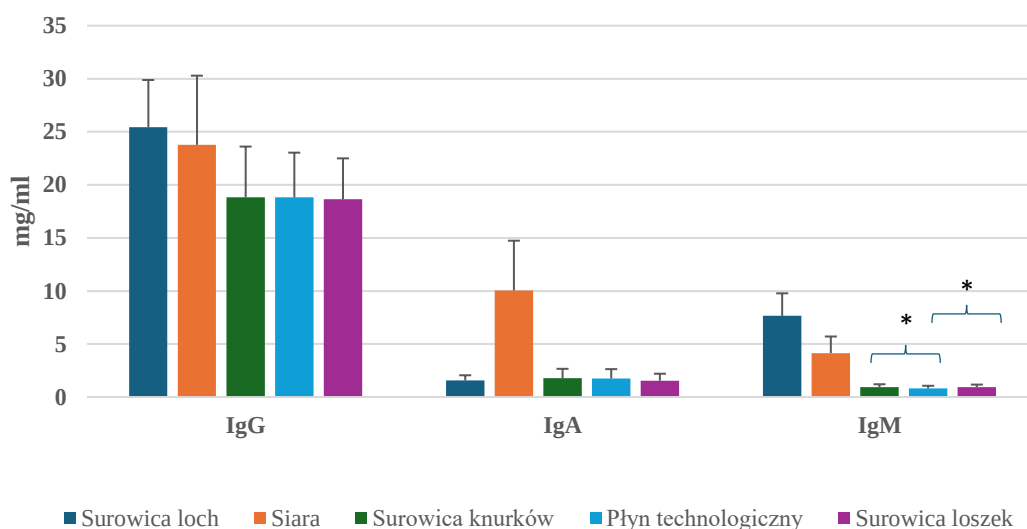
7.1.1. Immunoglobuliny

W każdym typie analizowanego materiału (próbek) najwyższe stężenia potwierdzono dla IgG (Ryc. 1). Zakresy stężeń tej Ig przedstawiały się następująco: 16,6-36,5 mg/ml w surowicy loch, 12,4-39,3 mg/ml w siarze, 9,6-32,8 mg/ml w surowicy

knurków, 2,6-31,3 mg/ml w PF i 10,0-29,7 mg/ml w surowicy loszek. Nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic pomiędzy średnim stężeniem IgG odnotowanym w poszczególnych rodzajach materiału pobranego od prosiąt ($p>0,05$, Ryc. 1). Istotną statystycznie, słabą, dodatnią korelację stwierdzono wyłącznie pomiędzy stężeniem IgG w surowicy loch i surowicy loszek (Tabela 5).

IgA była drugą, pod względem odnotowywanych średnich stężeń, klasą Ig w każdym z badanych materiałów, z wyjątkiem surowicy lochy, gdzie jej średnie stężenie osiągnęło najniższe wartości (Ryc. 1). Odnotowane zakresy stężeń IgA wynosiły 0,9-2,6 mg/ml w surowicy loch, 3,1-18,8 mg/ml w siarce, 0,7-4 mg/ml w surowicy knurków, 0,6-4,3 mg/ml w PF i 0,7-3,2 mg/ml w surowicy loszek. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi stężeniami tej klasy przeciwciał w różnych rodzajach materiału pobranego od prosiąt ($p>0,05$, Ryc. 1). Istotne statystycznie, dodatnie korelacje zostały zaobserwowane pomiędzy stężeniem IgA w surowicy loch i surowicy loszek oraz w surowicy loch i PF, o sile odpowiednio umiarkowanej oraz słabej (Tabela 5).

IgM osiągnęła najniższe średnie stężenia we wszystkich rodzajach badanego materiału, z wyjątkiem surowicy loch, w której średnie stężenie IgM było wyższe od średniego stężenia IgA (Ryc. 1). Zakresy odnotowanych stężeń IgM w surowicy loch wynosiły 4,3-12,6 mg/ml, w siarce 2,5-10,3 mg/ml, w surowicy knurków 0,4-1,7 mg/ml, 0,4-1,9 mg/ml w PF i 0,6-1,7 mg/ml w surowicy loszek. W przypadku tej klasy Ig stwierdzono istotnie statystyczne różnice pomiędzy jej średnim stężeniem w PF oraz w surowicy prosiąt obu płci ($p<0,05$, Ryc. 1).



Ryc. 1. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń (mg/ml) IgG, IgA oraz IgM w badanym materiale;
* $p < 0,05$

Tabela 5. Korelacje pomiędzy stężeniami IgG, IgA i IgM w analizowanych próbkach. Nawiasy zawierają wartość p dla każdej korelacji.

Material	Immunoglobuliny					
	IgG		IgA		IgM	
	SL	S	SL	S	SL	S
SK	0,02 ($p=0,85$)	0,14 ($p=0,09$)	0,14 ($p=0,09$)	-0,12 ($p=0,16$)	-0,00 ($p=0,98$)	0,05 ($p=0,57$)
PF	-0,08 ($p=0,35$)	-0,04 ($p=0,62$)	0,25* ($p=0,00$)	-0,10 ($p=0,23$)	-0,08 ($p=0,31$)	0,04 ($p=0,59$)
SLo	0,23* ($p=0,03$)	0,16 ($p=0,13$)	0,54* ($p=0,00$)	-0,12 ($p=0,05$)	-0,06 ($p=0,59$)	0,04 ($p=0,70$)

SL – surowica loch, S – siara, SK – surowica knurków, SLo – surowica loszek

*Korelacja istotna statystycznie ($p < 0,05$)

7.1.2. Cytokiny

Spośród analizowanych cytokin, najwyższe wartości stężeń we wszystkich rodzajach badanego materiału, z wyjątkiem PF, oznaczono dla IFN- γ (Ryc. 2, Ryc. 3). Zakresy odnotowanych stężeń IFN- γ w surowicy loch wynosiły 0,6-13,7 ng/ml, w siarze 0,5-9,5 ng/ml, w surowicy knurków 0,5-11,2 ng/ml, w PF 0,5-10,5 ng/ml, a w surowicy loszek 0,6-13,7 ng/ml. Nie stwierdzono istotnie statystycznie różnic pomiędzy średnimi stężeniami tej cytokiny w poszczególnych typach analizowanego materiału pobranego od

prosiąt ($p > 0,05$, Ryc. 2). Dodatkowo, istotnie statystyczne korelacje stwierdzono pomiędzy stężeniami IFN- γ we wszystkich zestawionych parach próbek (Tabela 6). Silne zależności zaobserwowano pomiędzy stężeniami IFN- γ (malejąco) w siarze i surowicy loszek, siarze i surowicy knurków, surowicy loch i loszek oraz siarze i PF (Tabela 6). Korelacje pomiędzy pozostałymi parami ocenianych materiałów były umiarkowane (Tabela 6).

IL-1 β była drugą, pod względem odnotowanych średnich stężeń, cytokiną we wszystkich rodzajach badanego materiału, z wyjątkiem PF, gdzie jej średnie stężenie przewyższyło średnie stężenie IFN- γ (Ryc. 2, Ryc. 3). Odnotowano następujące minimalne i maksymalne wartości stężeń IL-1 β : 310,0 i 6895,0 pg/ml w surowicy loch, 397,4 i 7976,0 pg/ml w siarze, 122,0 i 4674,0 pg/ml w surowicy knurków, 192,7 i 4691,2 pg/ml w PF i 127,3 i 5234,6 pg/ml w surowicy loszek. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi stężeniami IL-1 β w poszczególnych rodzajach analizowanych próbek pobranych od prosiąt ($p > 0,05$, Ryc. 3). Istotnie statystycznie, dodatkowo, silne korelacje zaobserwowano pomiędzy stężeniami tej cytokiny we wszystkich zestawionych parach materiałów, z wyjątkiem surowic loch i loszek, w przypadku których, zaobserwowana zależność była umiarkowana (Tabela 6).

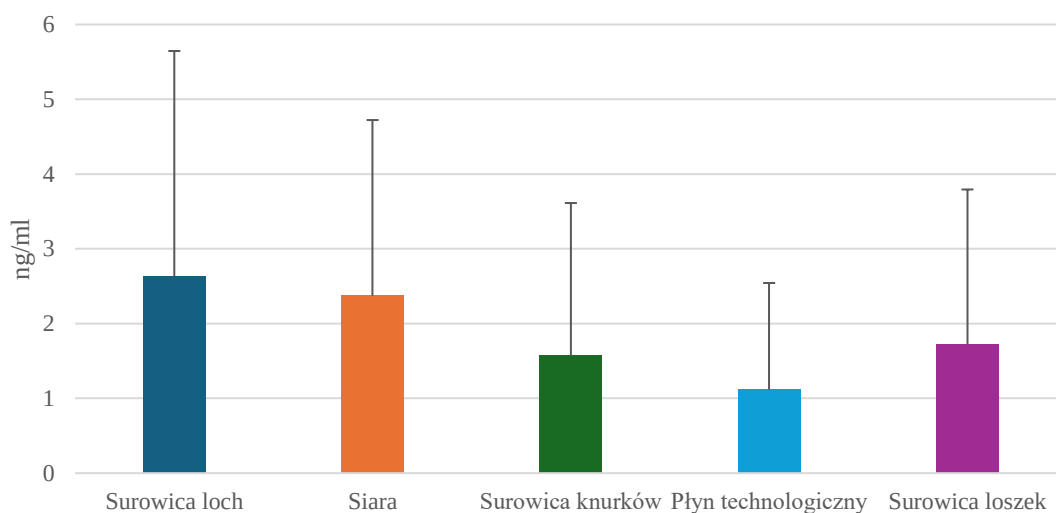
Średnie stężenia IL-6 we wszystkich rodzajach analizowanego materiału były niższe od średnich stężeń IFN- γ oraz IL-1 β (Ryc. 2, Ryc. 3). Zakresy odnotowanych wartości stężeń IL-6 wynosiły 332,7-2310,7 pg/ml w surowicy loch, 289,3-2247,4 pg/ml w siarze, 56,8-2266,4 pg/ml w surowicy knurków, 67,5-2398,2 pg/ml w PF i 82,7-2378,4 pg/ml w surowicy loszek. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi stężeniami tej cytokiny w poszczególnych rodzajach analizowanego materiału pobranego od prosiąt ($p > 0,05$, Ryc. 3). Istotnie statystycznie, dodatkowo korelacje zaobserwowano pomiędzy stężeniami tej cytokiny we wszystkich zestawionych parach materiałów (Tabela 6). Silną zależność zaobserwowano pomiędzy stężeniami IL-6 w surowicy loch i loszek (Tabela 6). Pomiedzy pozostałymi zestawionymi parami analizowanych materiałów, zaobserwowane zależności były umiarkowane (Tabela 6).

Średnie stężenia IL-4 i IL-8 we wszystkich badanych typach materiałów były niższe od średnich stężeń IFN- γ , IL-1 β i IL-6 (Ryc. 2, Ryc. 3). Średnie stężenie IL-4 w surowicy loch, knurków oraz loszek było wyższe od średnich stężeń IL-8, natomiast w siarze i PF było niższe od średnich stężeń IL-8 (Ryc. 2, Ryc. 3). Zakresy odnotowanych stężeń IL-4 wynosiły 5,2-567,4 pg/ml w surowicy loch, 7,8-506,2 pg/ml w siarze,

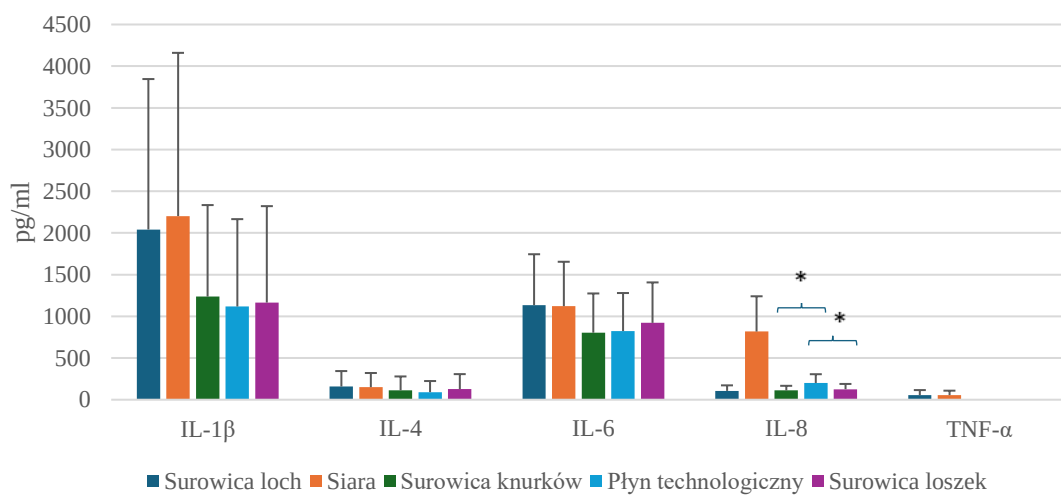
1,4-601,0 pg/ml w surowicy knurków, 1,1-569,0 pg/ml w PF i 1,4-601,4 pg/ml w surowicy loszek. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi stężeniami IL-4 w poszczególnych rodzajach analizowanego materiału pobranego od prosiąt ($p>0,05$, Ryc. 3). Istotne statystycznie, dodatnie korelacje zaobserwowano pomiędzy stężeniami tej cytokiny we wszystkich zestawionych parach materiałów (Tabela 6). Pomiedzy stężeniami IL-4 w siarze i surowicy loszek stwierdzono bardzo silną zależność (Tabela 6). Pomiedzy pozostałymi zestawionymi parami analizowanych materiałów, zaobserwowane zależności były silne (Tabela 6).

Odnutowane minimalne i maksymalne wartości stężeń IL-8 wynosiły 26,0 i 301,1 pg/ml w surowicy loch, 333,4 i 1965,0 pg/ml w siarze, 23,2 i 319,3 pg/ml w surowicy knurków, 42,3 i 573,1 pg/ml w PF i 21,1 i 316,8 pg/ml w surowicy loszek. W przypadku tej cytokiny, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi wartościami jej stężeń w surowicach loszek i knurków ($p>0,05$, Ryc. 3), ale takie różnice zaobserwowano pomiędzy surowicami prosiąt obu płci i PF ($p<0,05$, Ryc. 3). Stwierdzono istotne statystycznie, dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem IL-8 w surowicy loch i surowicy knurków oraz w surowicy loch i PF ($p<0,05$), jednakże niskie wartości r_s sugerują brak związku liniowego (Tabela 6). Zaobserwowano także istotne statystyczne, ujemne korelacje pomiędzy stężeniem tej cytokiny w siarze i surowicach prosiąt obu płci (Tabela 6). Zależność między siarą a surowicą knurków była słaba, a pomiędzy siarą a surowicą loszek umiarkowana (Tabela 6).

TNF- α osiągnął najniższe średnie wartości stężeń spośród analizowanych cytokin (Ryc. 2, Ryc. 3). Zakresy odnotowanych stężeń w surowicy loch wyniosły 21,0-210,0 pg/ml, a w siarze 22,0-360 pg/ml. Stężenia TNF- α w pozostałych rodzajach analizowanego materiału były poniżej granicy wykrywalności. Dlatego, w przypadku tej cytokiny odstąpiono od analizy statystycznej.



Ryc. 2. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń (ng/ml) IFN- γ w badanym materiale.



Ryc. 3. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń (pg/ml) IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 i TNF- α w badanym materiale; *p < 0,05

Tabela 6. Korelacje pomiędzy stężeniami IL- β , IL-4, IL-6, IL-8 i IFN- γ w analizowanych próbkach. Nawiasy zawierają wartość p dla każdej korelacji.

Material	Cytokiny									
	IL-1 β		IL-4		IL-6		IL-8		IFN- γ	
	SL	S	SL	S	SL	S	SL	S	SL	S
SK	0,75* (p=0,00)	0,80* (p=0,00)	0,71* (p=0,00)	0,79* (p=0,00)	0,65* (p=0,00)	0,67* (p=0,00)	0,18* (p=0,03)	-0,23* (p=0,01)	0,61* (p=0,00)	0,81* (p=0,00)
PT	0,76* (p=0,00)	0,78* (p=0,00)	0,74* (p=0,00)	0,79* (p=0,00)	0,57* (p=0,00)	0,62* (p=0,00)	0,198* (p=0,02)	-0,10 (p=0,24)	0,57* (p=0,00)	0,76* (p=0,00)
SLo	0,696* (p=0,00)	0,76* (p=0,00)	0,87* (p=0,00)	0,91* (p=0,00)	0,72* (p=0,00)	0,69* (p=0,00)	0,20 (p=0,07)	-0,42* (p=0,00)	0,78* (p=0,00)	0,89* (p=0,00)

SL – surowica loch, S – siara, SK – surowica knurków, SLo – surowica loszek

*Korelacja istotna statystycznie (p<0,05)

7.1.3. Białka ostrej fazy

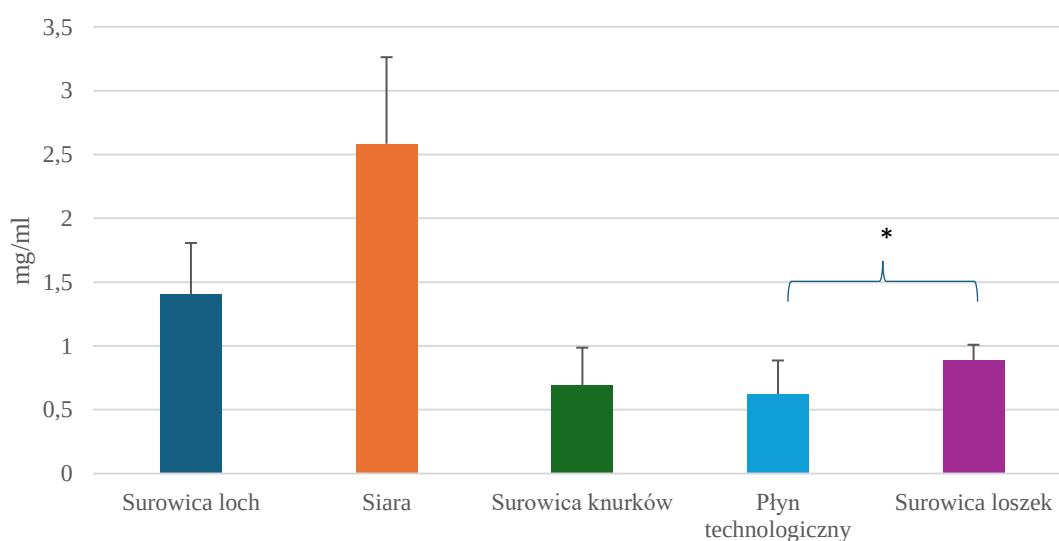
Spośród analizowanych APP, najwyższe średnie wartości stężeń w każdym typie badanego materiału, z wyjątkiem surowicy knurków, odnotowano dla Hp (Ryc. 4, Ryc. 5, Ryc. 6). Średnie stężenie Hp w surowicy knurków było niższe od średniego stężenia Pig-MAP (Ryc. 4, Ryc. 5). Zakresy odnotowanych minimalnych i maksymalnych wartości stężeń Hp wynosiły odpowiednio 0,8 i 2,3 mg/ml w surowicy loch, 1,6 i 3,9 mg/ml w siarze, 0,3 i 1,6 mg/ml w surowicy knurków, 0,03 i 1,4 mg/ml w PF i 0,3 i 8,8 mg/ml w surowicy loszek. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi stężeniami Hp w surowicach knurków i loszek oraz surowicy knurków i PF (p>0,05, Ryc. 4), natomiast takie różnice zostały zaobserwowane pomiędzy surowicą loszek a PF (p<0,05, Ryc. 4). Istotne statystycznie, dodatnie korelacje zaobserwowano pomiędzy stężeniami Hp w siarze i surowicy knurków, siarze i surowicy loszek oraz siarze i PF (Tabela 7). Zależność zaobserwowana pomiędzy stężeniami Hp w surowicy loszek i siarze była słaba (Tabela 7). Pozostałe zależności wskazywały na brak związku liniowego (Tabela 7).

Średnie wartości odnotowanych stężeń Pig-MAP we wszystkich rodzajach analizowanego materiału były niższe od średnich wartości odnotowanych dla Hp, z wyjątkiem surowicy knurków, w której Pig-MAP stanowiło APP o najwyższym stężeniu (Ryc. 4, Ryc. 5, Ryc. 6). Zakresy odnotowanych stężeń Pig-MAP w surowicy loch wynosiły 484,7-1391,8 μ g/ml, w siarze 457,4-1265,2 μ g/ml, w surowicy knurków

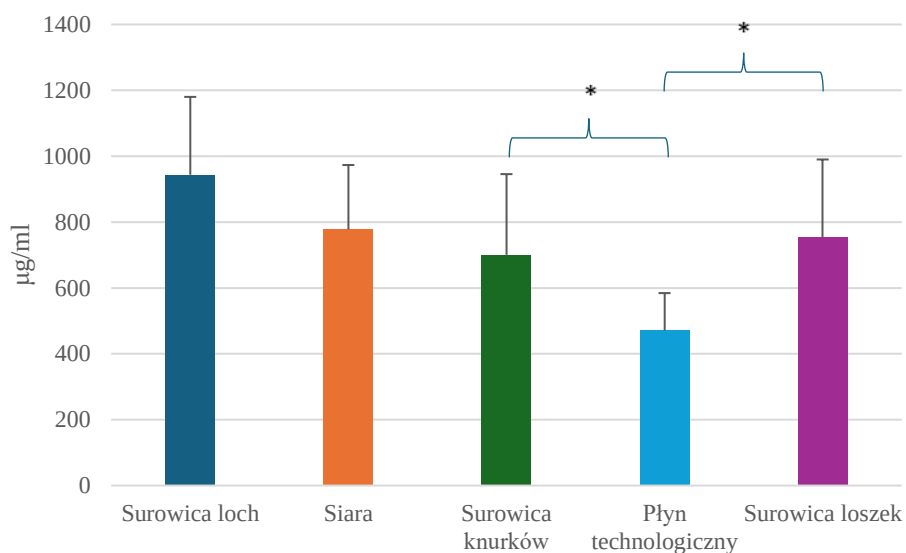
319,9-1471,0 $\mu\text{g/ml}$, w PF 352,5-1060,6 $\mu\text{g/ml}$, a w surowicy loszek 323,0-1537,3 $\mu\text{g/ml}$. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi wartościami stężeń Pig-MAP w surowicy knurków i loszek ($p>0,05$, Ryc. 5), ale zaobserwowano je pomiędzy PF a surowicami prosiąt obu płci ($p<0,05$, Ryc. 5). Istotne statystycznie, dodatnie korelacje zaobserwowano pomiędzy stężeniami tego APP we wszystkich zestawionych parach próbek, z wyjątkiem surowicy loch i PF, a obserwowane zależności były umiarkowane lub słabe (Tabela 7).

Najniższe średnie wartości stężeń spośród APP wykrytych we wszystkich typach badanego materiału zaobserwowano w przypadku CRP (Ryc. 4, Ryc. 5, Ryc. 6). Zakresy odnotowanych stężeń tego APP w surowicy loch wynosiły 7,9-61,5 $\mu\text{g/ml}$, w siarze 9,0-66,4 $\mu\text{g/ml}$, w surowicy knurków 2,4-29,6 $\mu\text{g/ml}$, w PF 4,3-25,6 $\mu\text{g/ml}$, a w surowicy loszek 3,3-38,1 $\mu\text{g/ml}$. Zaobserwowano istotnie statystycznie różnice pomiędzy średnimi stężeniami CRP w poszczególnych rodzajach analizowanego materiału pobranego od prosiąt ($p<0,05$, Ryc. 6). Istotną statystycznie, dodatnią korelację stwierdzono wyłącznie pomiędzy stężeniem CRP w surowicy loch i surowicy loszek i była ona słaba (Tabela 7).

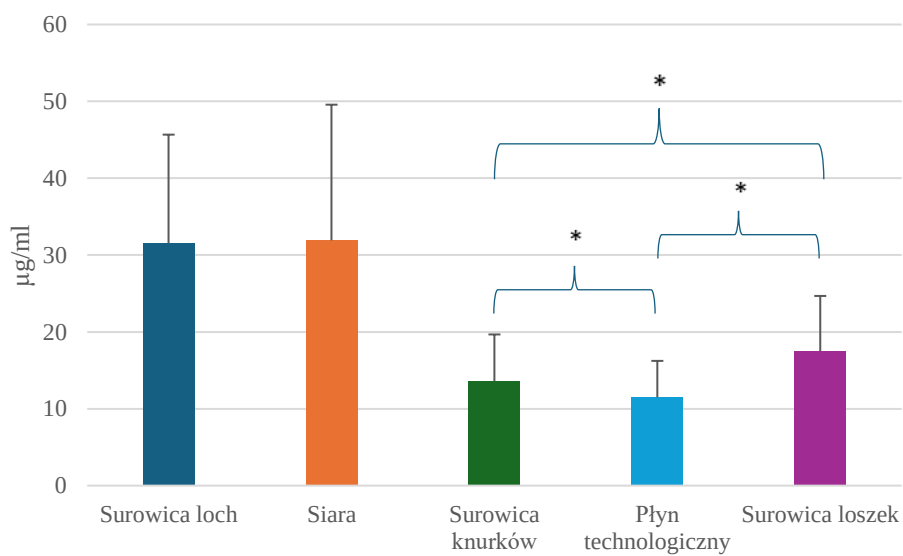
W większości analizowanych próbek, stężenia SAA nie przekraczało granicy wykrywalności użytego testu (0,31 $\mu\text{g/ml}$). Stężenia SAA możliwe do wykrycia stwierdzono jedynie w przypadku siary, ze średnim stężeniem dla tego typu próbki wynoszącym 13,17 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 4,04$). Z tego powodu, przeprowadzenie analiz statystycznych dla SAA było niemożliwe.



Ryc. 4. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń (mg/ml) Hp w badanym materiale; * $p<0,05$



Ryc. 5. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń Pig-MAP ($\mu\text{g/ml}$) w badanym materiale; * $p < 0,05$



Ryc. 6. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń CRP ($\mu\text{g/ml}$) w badanym materiale; * $p < 0,05$

Tabela 7. Korelacje pomiędzy stężeniami Hp, Pig-MAP i CRP w analizowanych próbkach. Nawiasy zawierają wartość p dla każdej korelacji.

Material	APP					
	Hp		Pig-MAP		CRP	
	SL	S	SL	S	SL	S
SK	0,02 (p=0,84)	0,17* (p=0,04)	0,36* (p=0,00)	0,57* (p=0,00)	0,02 (p=0,82)	0,04 (p=0,63)
PT	0,08 (p=0,32)	0,16* (p=0,048)	0,09 (p=0,23)	0,32* (p=0,00)	0,09 (p=0,26)	0,11 (p=0,2)
SLo	0,05 (p=0,65)	0,37* (p=0,00)	0,23* (p=0,03)	0,42* (p=0,00)	0,26* (p=0,01)	0,11 (p=0,32)

SL – surowica loch, S – siara, SK – surowica knurków, SLo – surowica loszek

*Korelacja istotna statystycznie (p<0,05)

7.2. Eksperyment 2

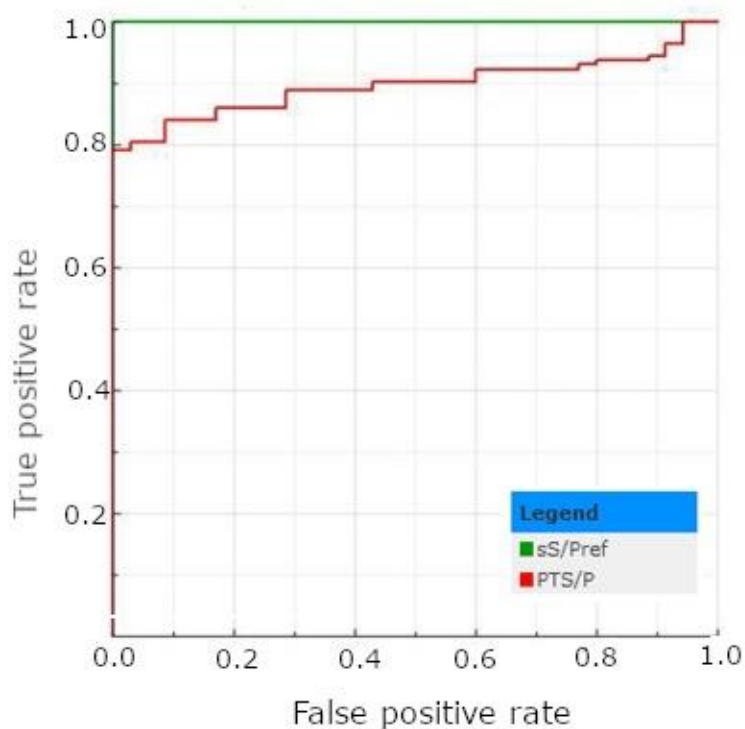
Poniżej przedstawiono wyniki badań zawarte w artykule:

Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Field study on the utility of fluid obtained from testicles as a sample for detecting antibodies to selected swine pathogens. Scientific Reports. 2025, 15: 22402.

Obecność wszystkich badanych przeciwciał swoistych (anty-App, anty-Ery, anty-HEV, anty-PEDV, anty-IAV, anty-Mhp) została potwierdzona w PF.

7.2.1. Przeciwciała przeciwko *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Analiza krzywych ROC wykazała, że punkt odcięcia dla próbek PF wynoszący 15% S/P% pozwoli na uzyskanie wyników najbardziej zbliżonych do tych uzyskanych przy pomocy tzw. złotego standardu (surowicy) i powinien być uznany za optymalny (OT) dla tego rodzaju próbki. Wyniki uzyskane w oparciu o interpretację o ten punkt odcięcia cechują się największą dokładnością oraz najwyższą wartością wskaźnika AUC (Ryc.7, Tabela 8).



Ryc. 7. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko App, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Tabela 8. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko App, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Klasyfikator	AUC	ACC	OT
sS/Pref	1,0000	1,000	27
PTS/P	0,8971	0,8539	15

Klasyfikatory: sS/Pref - wyniki dla surowicy; PTS/P – wyniki dla płynu technologicznego.

Optymalny punkt odcięcia (OT) obliczony przy pomocy analizy ROC został wyznaczony na poziomie 15% S/P%. Próbkę PF, dla których uzyskano wartości równe lub powyżej tej wartości powinny być uznane za dodatnie. Natomiast te z niższymi wartościami OT, reprezentują próbki ujemne.

Dla wyznaczonego, przy pomocy analizy krzywych ROC, OT oraz zastosowanego testu ELISA określono czułość, swoistość, PPV (prawdopodobieństwo, że w próbce obecne są analizowane przeciwciała przy dodatnim wyniku testu), NPV (prawdopodobieństwo, że w próbce brak jest analizowanych przeciwciał przy negatywnym wyniku testu), dokładność i współczynnik kappa (zgodność pomiarów tej samej zmiennej różnymi metodami), które przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko App dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Punkt odcięcia (S/P%)	R	OT
	27	15
Czułość	0,65	0,82
Swoistość	1	0,86
PPV	1	0,96
NPV	0,41	0,54
Dokładność	0,72	0,83
Współczynnik κ	0,42	0,55

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy

Zastosowanie wyznaczonego OT spowodowało poprawę niektórych parametrów walidacyjnych testu jak czułość, NPV i dokładność, jednocześnie obniżając pozostałe z nich (Tabela 9). Poprawie uległ również współczynnik κ , jednakże nie wpłynęło to na zmianę klasyfikacji zgodności, która pozostała umiarkowana (Tabela 9). Wartość AUC obliczona dla PF została określona jako znaczna, jednak była istotnie niższa, w porównaniu do złotego standardu ($p < 0,05$, Ryc. 7, Tabela 8).

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy odsetkiem dodatnich próbek w surowicy knurków i loszek ($p > 0,05$, Tabela 10). Przy klasyfikacji wyników próbek PF analizowanych na podstawie punktu odcięcia rekomendowanego przez producenta testu stwierdzono istotnie statystyczne różnice w odsetku próbek dodatnich pomiędzy surowicami knurków i loszek a PF ($p < 0,05$, Tabela 10). Zastosowanie OT do klasyfikacji próbek PF zwiększyło liczbę próbek PF uznanych za dodatnie, ale nie wpłynęło na istotność obserwowanych różnic ($p < 0,05$, Tabela 10).

Tabela 10. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko App), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Rodzaj próbki	Dodatnie/ogółem	Odsetek dodatnich (%)	95%CI
Surowica knurek	143/178	80,34 ^a	73,88-85,51
Surowica loszka	132/159	83,02 ^a	76,42-88,06
PF R	93/178	52,25 ^b	44,94-59,46
PF OT	122/178	68,54 ^c	61,39-74,91

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy, 95% CI - 95% przedział ufności, ^{a,b,c} – różne litery odzwierciedlają istotne statystycznie różnice, pomiędzy poszczególnymi rodzajami próbek ($p < 0,05$)

7.2.1.1. Wpływ pulowania na uzyskane wyniki

Na podstawie interpretacji wyników analiz pulowanych nisko-dodatnich próbek PF, zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu, tylko jedna z próbek, o rozcieńczeniu 1:10 została zaklasyfikowana jako dodatnia (Tabela 11). Interpretacja wyników analiz rozcieńczeń nisko-dodatnich próbek według OT dla PF zwiększyła liczbę próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie. Za dodatnie zostały uznane wszystkie próbki pulowane w stosunku 1:10, 1:20 oraz dwie z trzech o rozcieńczeniu 1:40. Łącznie, 8% (1/12) i 66% (8/12) pulowanych nisko-dodatnich próbek PF zostało prawidłowo zaklasyfikowanych jako dodatnie, w zależności od zastosowanego punktu odcięcia (odpowiednio rekomendowany przez producenta i wskazany jako OT w analizie ROC, Tabela 11).

W przypadku interpretacji wyników analiz rozcieńczeń próbek umiarkowanie-dodatnich według punktu odcięcia rekomendowanego przez producenta testu, wszystkie próbki o rozcieńczeniu 1:10 i jedna o rozcieńczeniu 1:20 sklasyfikowano jako dodatnie (Tabela 11). Gdy wyniki analiz interpretowano w oparciu o OT, to wszystkie próbki o rozcieńczeniach 1:10, 1:20 i 1:40 sklasyfikowano jako dodatnie. Zatem, 33% (4/12) i 75% (9/12) rozcieńczeń umiarkowanie-dodatnich próbek PF zostało prawidłowo

zaklasyfikowanych jako dodatnie, w zależności od zastosowanego punktu odcięcia (Tabela 11).

Przy interpretacji wyników analiz rozcieńczeń wysoko-dodatnich PF według punktu odcięcia rekomendowanego przez producenta testu, wszystkie próbki o rozcieńczeniu 1:10 i jedna o rozcieńczeniu 1:20 zostały uznane za dodatnie (Tabela 11). Interpretacja wyników analiz według OT zwiększyła liczbę próbek uznawanych za dodatnie, tak, że tylko 1 próbka o rozcieńczeniu 1:80 została sklasyfikowana jako ujemna. Zatem 33% (4/12) i 92% (11/12) rozcieńczeń wysoko-dodatnich próbek PF zostało prawidłowo sklasyfikowanych jako dodatnie, w zależności od zastosowanego punktu odcięcia (Tabela 11).

Tabela 11. Klasyfikacja szeregu rozcieńczeń nisko-, umiarkowanie- i wysoko-dodatnich próbek (zawierających przeciwciała przeciwko App) w zależności od przyjętego punktu odcięcia.

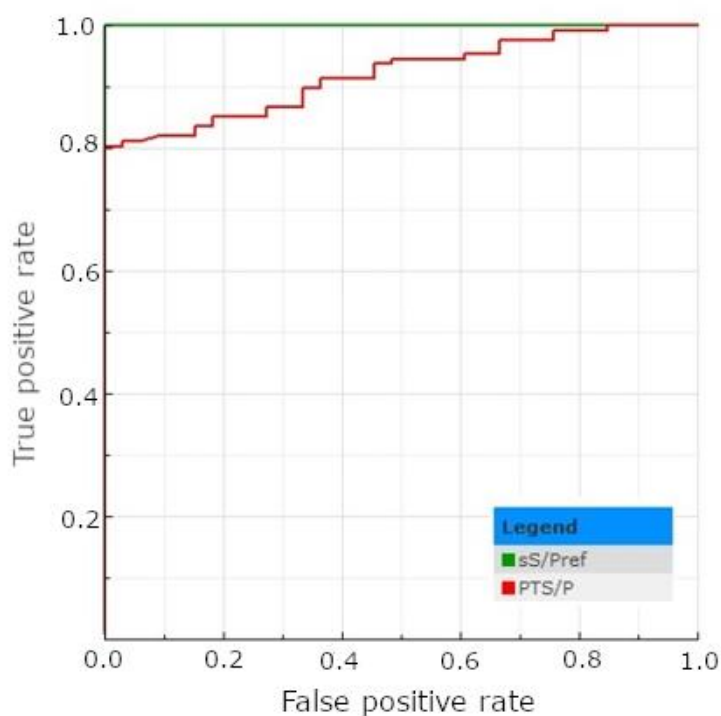
Próbki	Numer próbki	Rozcieńczenie	Klasyfikacja w oparciu o R	Klasyfikacja w oparciu o OT
Nisko-dodatnie	1	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
	2	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
	3	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	0
		1:80	0	0
Umiarkowanie-dodatnie	1	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
	2	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
	3	1:10	1	1
		1:20	1	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
Wysoko-dodatnie	1	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1
	2	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
	3	1:10	1	1
		1:20	1	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy, 0 – próbka zaklasyfikowana jako ujemna, 1 – próbka zaklasyfikowana jako dodatnia

7.2.2. Przeciwciała przeciwko *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Za pomocą analizy krzywych ROC wykazano, że wyniki najbardziej zbliżone do wyników analiz złotego standardu (surowicy) zostaną uzyskane, gdy za punkt odcięcia dla PF zostanie przyjęte IRPC 14,5. Interpretacja wyników analiz w oparciu o ten punkt odcięcia charakteryzowała się największą dokładnością i najwyższą wartością wskaźnika AUC (Ryc. 8, Tabela 12), przez co wartość ta powinna zostać uznana za OT dla PF.

IRPC na poziomie 14,5 zostało więc w dalszych analizach przyjęte jako OT dla PF. Próbkę PF, w przypadku których uzyskano wartości równe lub powyżej OT były klasyfikowane jako dodatnie, podczas gdy te z niższymi wartościami, były uznawane za ujemne.



Ryc. 8. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Ery, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Tabela 12. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Ery, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Klasyfikator	AUC	ACC	OT
sS/Pref	1,0000	1,000	40
PTS/P	0,9197	0,8563	14,5

Klasyfikatory: sS/Pref - wyniki dla surowicy; PTS/P – wyniki dla płynu technologicznego.

Dla OT i zastosowanego testu ELISA obliczono następujące parametry walidacyjne: czułość, swoistość, PPV, NPV, dokładność oraz współczynnik κ , które zostały przedstawione w Tabeli 13.

Tabela 13. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Ery dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Punkt odcięcia (IRPC)	R	OT
	40	14,5
Czułość	0,70	0,91
Swoistość	1	0,64
PPV	1	0,91
NPV	0,46	0,64
Dokładność	0,76	0,85
Współczynnik κ	0,49	0,54

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy

Zastosowanie optymalnego dla PF punktu odcięcia wpłynęło na poprawę niektórych parametrów walidacyjnych testu jak czułość, NPV i dokładność, jednocześnie obniżając swoistość i NPV (Tabela 13). Zaobserwowano także niewielki wzrost

współczynnika κ , który nie wpłynął na zmianę klasyfikacji zgodności pozostawiając ją umiarkowaną (Tabela 13). Wartość AUC obliczona dla PF, mimo że była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do standardu, to była klasyfikowana jako doskonała ($p < 0,05$, Ryc. 8, Tabela 12).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy odsetkiem dodatnich surowic knurków i loszek ($p > 0,05$, Tabela 14). Istotne statystycznie różnice zostały zaobserwowane w odsetku dodatnich próbek pomiędzy surowicami prosiąt obu płci, a PF, gdy wyniki analiz tego materiału były interpretowane zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu ($p < 0,05$, Tabela 14). Interpretacja wyników analiz PF zgodnie z OT zwiększyła liczbę próbek PF klasyfikowanych jako dodatnie, co poskutkowało brakiem istotnych statystycznie różnic pomiędzy odsetkiem próbek dodatnich w surowicach prosiąt i PF ($p > 0,05$, Tabela 14).

Tabela 14. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko Ery), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Rodzaj próbki	Dodatnie/ogółem	Odsetek dodatnich (%)	95% CI
Surowica knurek	127/160	79,38 ^a	72,45-84,92
Surowica loszka	126/154	81,82 ^a	74,98-87,11
PF R	89/160	55,62 ^b	47,88-63,1
PF OT	127/160	79,38 ^a	72,45-84,92

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy, 95% CI - 95% przedział ufności, ^{a,b} – poszczególne litery odzwierciedlają istotne statystycznie różnice, pomiędzy poszczególnymi rodzajami próbek ($p < 0,05$)

7.2.2.1. Wpływ pulowania na uzyskane wyniki

Interpretując wyniki analiz rozcieńczeń nisko-dodatnich próbek PF według punktu odcięcia rekomendowanego przez producenta testu, wszystkie próbki bez względu na ich rozcieńczenie zostały sklasyfikowane jako ujemne (Tabela 15). W przypadku interpretacji wyników analiz zgodnie z OT, wszystkie próbki o rozcieńczeniu 1:10 oraz jedna o rozcieńczeniu 1:20 zostały uznane za dodatnie. W zależności od przyjętego punktu odcięcia, rekomendowanego przez producenta dla

próbek surowicy i OT dla PF, odpowiednio 0% (0/12) i 33% (4/12) rozcieńczeń nisko-dodatnich próbek PF zostało poprawnie sklasyfikowanych (Tabela 15).

Na podstawie wyników analiz rozcieńczeń umiarkowanie-dodatnich próbek PF interpretowanych według punktu odcięcia rekomendowanego przez producenta testu, dwie próbki, jedna o rozcieńczeniu 1:10 i jedna o rozcieńczeniu 1:20 zostały sklasyfikowane jako dodatnie (Tabela 15). Klasyfikując wyniki analiz w oparciu o optymalny dla PF punkt odcięcia, wszystkie próbki o rozcieńczeniu 1:10 i 1:20 oraz jedna o rozcieńczeniu 1:40 zostały uznane za dodatnie. W zależności od przyjętego punktu odcięcia, 16,7% (2/12) i 58,3% (7/12) pulowanych umiarkowanie-dodatnich próbek PF zostało prawidłowo sklasyfikowanych (Tabela 15).

W przypadku interpretacji wyników analiz rozcieńczeń wysoko-dodatnich próbek PF według punktu odcięcia rekomendowanego przez producenta testu, wszystkie próbki o rozcieńczeniu 1:10 i jedna o rozcieńczeniu 1:20 zostały sklasyfikowane jako dodatnie (Tabela 15). Wszystkie próbki PF, bez względu na stopień rozcieńczenia, zostały uznane za dodatnie, gdy wyniki były interpretowane w oparciu o OT. W rezultacie, 33,3% (4/12) i 100% (12/12) próbek zostało zaklasyfikowanych poprawnie, w zależności od przyjętego punktu odcięcia (Tabela 15).

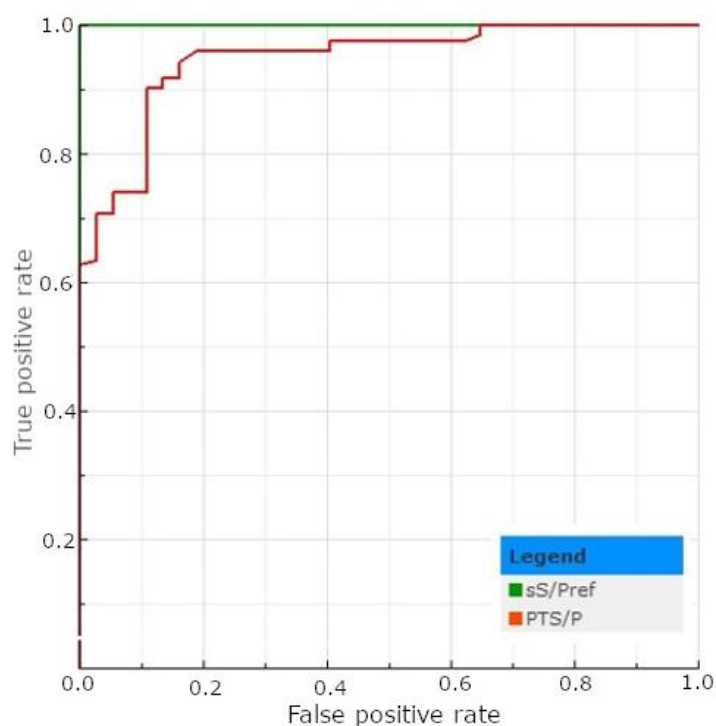
Tabela 15. Klasyfikacja szeregu rozcieńczeń nisko-, umiarkowanie- i wysoko-dodatnich próbek (zawierających przeciwciała przeciwko Ery) w zależności od przyjętego punktu odcięcia.

Próbki	Numer próbki	Rozcieńczenie	Klasyfikacja w oparciu o R	Klasyfikacja w oparciu o OT
Nisko-dodatnie	1	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	2	1:10	0	1
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	3	1:10	0	1
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
Umiarkowanie-dodatnie	1	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	2	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	3	1:10	1	1
		1:20	1	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
Wysoko-dodatnie	1	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1
	2	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1
	3	1:10	1	1
		1:20	1	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy, 0 – próbka zaklasyfikowana jako ujemna, 1 – próbka zaklasyfikowana jako dodatnia

7.2.3. Przeciwciała przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu E

Analiza krzywej ROC wykazała, że wyniki najbardziej zbliżone do złotego standardu zostaną otrzymane, gdy za punkt odcięcia dla próbek PF zostanie przyjęta wartość $S/P\% > 45\%$. Klasyfikacja wyników analiz próbek PF przeprowadzona w oparciu o ten punkt odcięcia charakteryzowała się największą dokładnością oraz najwyższą wartością wskaźnika AUC (Ryc. 9, Tabela 16).



Ryc. 9. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko HEV, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Tabela 16. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko HEV, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Klasyfikator	AUC	ACC	OT
sS/Pref	1,0000	1,000	65
PTS/P	0,9473	0,9250	45

Klasyfikatory: sS/Pref - wyniki dla surowicy; PTS/P – wyniki dla płynu technologicznego.

Wartość $S/P\% > 45\%$ została przyjęta za OT dla próbek PF. Próbki PF, dla których uzyskano wartości wyższe bądź równe, powinny być klasyfikowane jako dodatnie, natomiast w przypadku wartości niższych, jako ujemne.

Dla wyznaczonego przy pomocy analizy krzywej ROC OT oraz zastosowanego testu ELISA, określono następujące parametry walidacyjne: czułość, swoistość, PPV, NPV, dokładność oraz współczynnik κ , które przedstawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko HEV dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Punkt odcięcia (S/P%)	R	OT
	65	45
Czułość	0,88	0,96
Swoistość	0,97	0,78
PPV	0,99	0,94
NPV	0,71	0,85
Dokładność	0,9	0,92
Współczynnik κ	0,75	0,76

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy.

Zastosowanie optymalnego dla PF punktu odcięcia spowodowało poprawę niektórych parametrów walidacyjnych testu, takich jak czułość, NPV i dokładność, jednocześnie obniżając swoistość i PPV (Tabela 17). Zaobserwowany wzrost współczynnika κ był minimalny (Tabela 17) i nie wpłynął na zmianę klasyfikacji zgodności, która pozostała znaczna. Wartość AUC obliczona dla PF mimo tego, że istotnie statystycznie różniła się od standardu ($p < 0,05$, Ryc. 9, Tabela 16), to została zaklasyfikowana jako doskonała.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy odsetkiem dodatnich próbek surowicy knurków i loszek ($p > 0,05$, Tabela 18). Przy interpretacji wyników analiz próbek PF w oparciu o punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu, zaobserwowano istotne statystycznie różnice pomiędzy odsetkiem dodatnich próbek

w surowicy loszek i PF ($p < 0,05$, Tabela 18), przy jednoczesnym braku różnic pomiędzy surowicą knurek i PF ($p > 0,05$, Tabela 18). Interpretacja wyników analiz PF w oparciu o OT spowodowała wzrost liczby próbek PF klasyfikowanych jako dodatnie i zanik istotnych statystycznie różnic pomiędzy odsetkiem próbek sklasyfikowanych jako dodatnie w surowicy loszek i PF ($p > 0,05$, Tabela 18).

Tabela 18. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko HEV), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Rodzaj próbki	Dodatnie/ogółem	Odsetek dodatnich (%)	95% CI
Surowica knurek	123/160	76,88 ^{a,b}	69,76-82,73
Surowica loszka	116/144	80,56 ^a	73,33-86,19
PF R	109/160	68,12 ^b	60,55-74,85
PF OT	126/160	78,75 ^a	71,78-84,38

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy, 95% CI - 95% przedział ufności, ^{a,b} – poszczególne litery odzwierciedlają istotne statystycznie różnice, pomiędzy poszczególnymi rodzajami próbek ($p < 0,05$)

7.2.3.1. Wpływ pulowania na uzyskane wyniki

Żadna spośród nisko-dodatnich próbek PF, bez względu na stopień rozcieńczenia, nie została zaklasyfikowana jako dodatnia, gdy wyniki analiz były interpretowane zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu (Tabela 19). Przy interpretacji wyników zgodnie z OT, jedna spośród analizowanych próbek, o rozcieńczeniu 1:10 została uznana za dodatnią. W zależności od przyjętego punktu odcięcia, 0% (0/12) i 8,3% (1/12) rozcieńczeń nisko-dodatnich próbek PF zostało prawidłowo sklasyfikowanych (Tabela 19).

Podobnie, w przypadku wyników analizy rozcieńczeń umiarkowanie-dodatnich próbek PF zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu, żadna z próbek, niezależnie od stopnia jej rozcieńczenia, nie została sklasyfikowana jako dodatnia (Tabela 19). Gdy klasyfikacji próbek dokonywano zgodnie z OT, wszystkie

próbki o rozcieńczeniu 1:10 oraz jedna o rozcieńczeniu 1:20 zostały uznane za dodatnie. W zależności od przyjętego punktu odcięcia, 0% (0/12) i 33% (4/12) rozcieńczeń umiarkowanie-dodatnich próbek PF zostało prawidłowo sklasyfikowanych (Tabela 19).

Interpretując wyniki analiz rozcieńczeń wysoko-dodatnich próbek PF zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu, spośród przebadanych próbek, dwie próbki o rozcieńczeniu 1:10 i jedna o rozcieńczeniu 1:20 zostały sklasyfikowane jako dodatnie (Tabela 19). Klasyfikacja wyników zgodnie z OT skutkowałą wzrostem liczby próbek PF uznanych za dodatnie. Spośród przebadanych próbek, wszystkie próbki o rozcieńczeniu 1:10 oraz 1:20, dwie o rozcieńczeniu 1:40 oraz jedna rozcieńczona w stosunku 1:80 zostały uznane za dodatnie. W zależności od przyjętego punktu odcięcia, 25% (3/12) oraz 75% (9/12) rozcieńczeń wysoko-dodatnich próbek PF zostało prawidłowo sklasyfikowanych (Tabela 19).

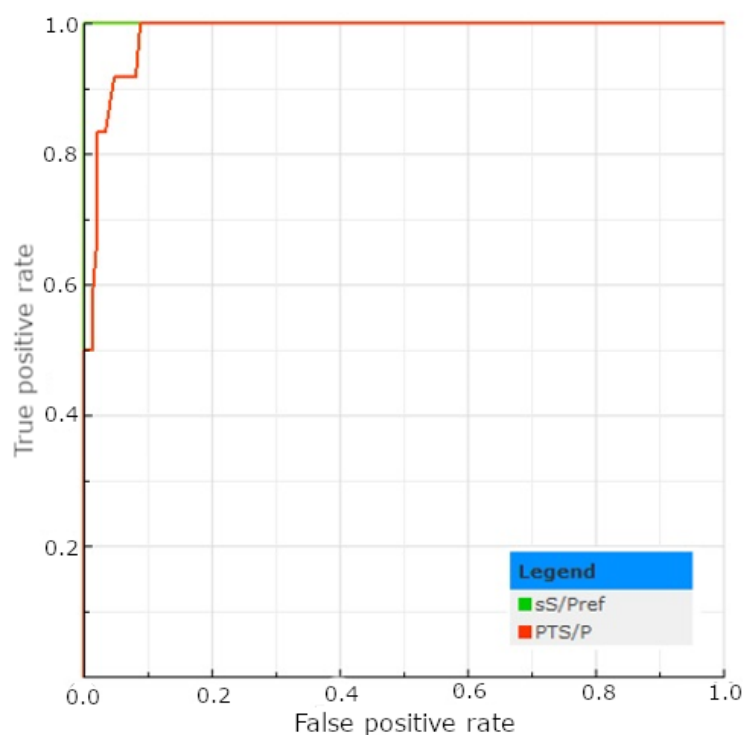
Tabela 19. Klasyfikacja szeregu rozcieńczeń nisko-, umiarkowanie- i wysoko-dodatnich próbek (zawierających przeciwciała przeciwko HEV) w zależności od przyjętego punktu odcięcia.

Próbki	Numer próbki	Rozcieńczenie	Klasyfikacja w oparciu o R	Klasyfikacja w oparciu o OT
Nisko-dodatnie	1	1:10	0	0
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	2	1:10	0	1
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	3	1:10	0	0
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
Umiarkowanie-dodatnie	1	1:10	0	1
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	2	1:10	0	1
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	3	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	0
		1:80	0	0
Wysoko-dodatnie	1	1:10	1	1
		1:20	1	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
	2	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	3	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy, 0 – próbka zaklasyfikowana jako ujemna, 1 – próbka zaklasyfikowana jako dodatnia

7.2.4. Przeciwciała przeciwko wirusowi epidemicznej biegunki świń

Analiza krzywej ROC wykazała, że punkt odcięcia dla próbek PF na poziomie 24% S/P% pozwoli na uzyskanie wyników w największym stopniu zbliżonych do tych uzyskanych podczas analiz surowicy. Wyniki analiz próbek PF uzyskane w oparciu o wyznaczony OT charakteryzowały się największą dokładnością oraz najwyższą wartością wskaźnika AUC (Ryc. 10, Tabela 20).



Ryc. 10. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko PEDV, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Tabela 20. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko PEDV, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Klasyfikator	AUC	ACC	OT
sS/Pref	1,0000	1,000	60
PTS/P	0,9837	0,9688	24

Klasyfikatory: sS/Pref - wyniki dla surowicy; PTS/P - wyniki dla płynu technologicznego.

Wartości wyników analiz próbek PF powyżej lub równe OT były uznawane za dodatnie, podczas gdy wartości mniejsze od OT za ujemne.

Dla wyznaczonego za pomocą analizy ROC OT oraz zastosowanego testu ELISA obliczono czułość, swoistość, PPV, NPV, dokładność oraz współczynnik κ , które zostały przedstawione w Tabeli 21.

Tabela 21. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko PEDV dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Punkt odcięcia (S/P%)	60	24
Czułość	0,42	0,83
Swoistość	1	0,97
PPV	1	0,77
NPV	0,95	0,99
Dokładność	0,96	0,97
Współczynnik κ	0,57	0,78

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy.

Zastosowanie OT poprawiło parametry walidacyjne testu względem PF w zakresie czułości, NPV i dokładność, jednocześnie obniżając nieznacznie swoistość oraz PPV (Tabela 21). Odnotowano także znaczący wzrost współczynnika κ , powodujący zmianę klasyfikacji zgodności z umiarkowanej do znacznej (Tabela 21). Różnica pomiędzy wartością AUC wyznaczoną dla PF a standardem nie była istotna statystycznie, a wartość AUC została zaklasyfikowana jako doskonała ($p > 0,05$, Ryc. 10, Tabela 20).

Interpretując wyniki analiz próbek zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu, nie stwierdzono żadnych istotnie statystycznych różnic pomiędzy odsetkiem dodatnich próbek w poszczególnych typach badanego materiału ($p > 0,05$, Tabela 22). Interpretacja wyników analiz próbek PF w oparciu o OT spowodowała wzrost liczby próbek PF klasyfikowanych jako dodatnie (Tabela 22).

Tabela 22. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko PEDV), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

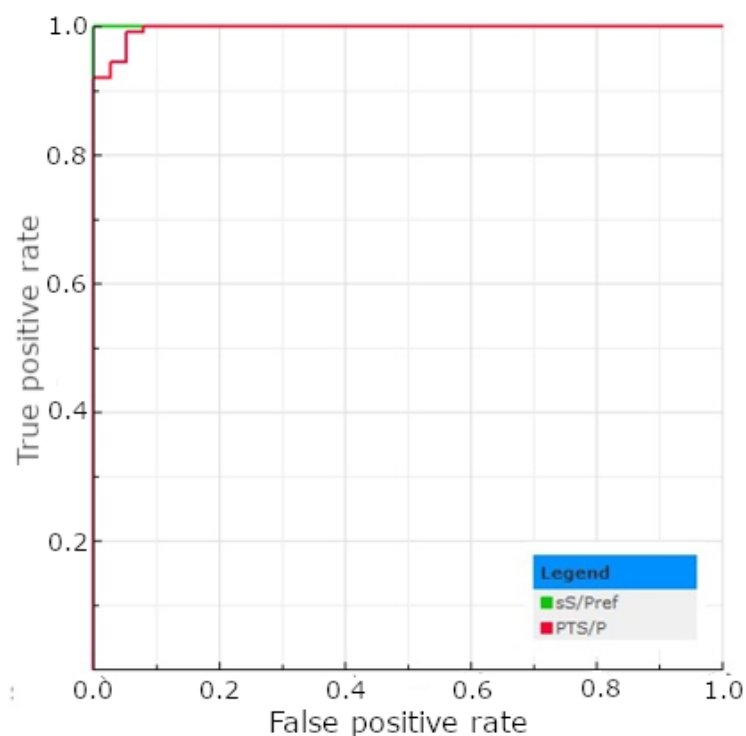
Rodzaj próbki	Dodatnie/ogółem	Odsetek dodatnich (%)	95%CI
Surowica knurek	12/160	7,5%	4,34-12,65
Surowica loszka	12/146	8,22%	4,76-13,82
PF R	5/160	3,12%	1,34-7,11
PF OT	13/160	8,13%	4,81-13,4

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy.
95% CI – 95% przedział ufności

Z uwagi na małą liczbę próbek dodatnich nie przeprowadzono oceny wpływu pulowania na wykrywanie specyficznych przeciwciał w próbkach PF.

7.2.5. Przeciwciała przeciwko wirusowi grypy typu A

Za pomocą analizy krzywej ROC wykazano, że interpretacja wyników analiz próbek PF zgodnie z punktem odcięcia wynoszącym S/N% 83% pozwoli na uzyskanie wyników, które będą najbardziej zbliżone do tych uzyskanych za pomocą złotego standardu. Wyniki uzyskane w oparciu o ten punkt odcięcia charakteryzowały się największą dokładnością oraz najwyższą wartością wskaźnika AUC (Ryc. 11, Tabela 23) w związku z czym, powinien zostać uznany za optymalny dla PF.



Ryc. 11. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko IAV, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Tabela 23. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko IAV, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Klasyfikator	AUC	ACC	OT
sS/Pref	1,0000	1,000	47
PTS/P	0,9962	0,9815	83

Klasyfikatory: sS/Pref - wyniki dla surowicy; PTS/P – wyniki dla płynu technologicznego.

Wartości S/N% wynoszące poniżej lub równe wartości OT były uznawane za dodatnie, podczas gdy wartości wyższe były uznawane za ujemne.

Dla wyznaczonego przy pomocy analizy ROC OT oraz zastosowanego testu ELISA obliczono czułość, swoistość, PPV, NPV, dokładność oraz współczynnik κ , które zostały przedstawione w Tabeli 24.

Tabela 24. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko IAV dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Punkt odcięcia (S/N%)	R	OT
	47	83
Czułość	0,66	0,99
Swoistość	1	0,92
PPV	1	0,98
NPV	0,46	0,97
Dokładność	0,74	0,98
Współczynnik κ	0,47	0,93

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy.

Zastosowanie optymalnego dla PF punktu odcięcia znacząco poprawiło wybrane parametry walidacyjne testu względem tego rodzaju materiału, takie jak czułość, NPV oraz dokładność, nieznacznie obniżając swoistość i PPV (Tabela 24). Zaobserwowano także znaczący wzrost współczynnika κ , co spowodowało zmianę klasyfikacji zgodności z umiarkowanej do doskonałej (Tabela 24). Różnica pomiędzy AUC obliczonym dla PF a standardem nie była istotna statystycznie, a wartość AUC została sklasyfikowana jako doskonała ($p>0,05$, Ryc. 11, Tabela 23).

Nie stwierdzono istotnych statystycznych różnic w odsetku dodatnich próbek pomiędzy surowicami knurków, a surowicami loszek ($p>0,05$, Tabela 25). Przy interpretacji wyników próbek PF w oparciu o punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu, zaobserwowano istotne statystycznie różnice w odsetku dodatnich próbek pomiędzy surowicami prosiąt i PF ($p<0,05$, Tabela 25). Interpretacja wyników próbek PF w oparciu o OT spowodowała wzrost liczby próbek PF klasyfikowanych jako dodatnie i brak istotnych różnic w odsetku dodatnich próbek pomiędzy poszczególnymi rodzajami analizowanego materiału ($p>0,05$, Tabela 25).

Tabela 25. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko IAV), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Rodzaj próbki	Dodatnie/ogółem	Odsetek	95%CI
		dodatnich (%)	
Surowica knurek	124/160	77,5% ^a	70,43-83,28
Surowica loszka	129/163	79,14% ^a	72,27-84,67
PF R	82/160	51,25% ^b	43,57-58,87
PF OT	125/160	78,12% ^a	71,1-83,83

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy, 95% CI – 95% przedział ufności, ^{a,b} – poszczególne litery odzwierciedlają istotne statystycznie różnice, pomiędzy poszczególnymi rodzajami próbek ($p < 0,05$)

7.2.5.1. Wpływ pulowania na uzyskane wyniki

Interpretując wyniki analiz rozcieńczeń nisko-dodatnich próbek PF zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu, żadna z próbek, bez względu na stopień rozcieńczenia, nie została sklasyfikowana jako dodatnia pod względem obecności specyficznych przeciwciał (Tabela 26). Przy interpretacji tych wyników zgodnie z OT, dwie próbki o rozcieńczeniu 1:10 sklasyfikowano jako dodatnie. W zależności od przyjętego punktu odcięcia, 0% (0/12) i 16,7% (2/12) rozcieńczeń nisko-dodatnich próbek PF zostało prawidłowo sklasyfikowanych (Tabela 26).

Podobnie, wszystkie próbki pulowane przygotowane z umiarkowanie-dodatnich próbek PF zostały uznane za ujemne, gdy wyniki były analizowane zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu (Tabela 26). Interpretując te same wyniki zgodnie z OT, wszystkie próbki o rozcieńczeniu 1:10, oraz po dwie o rozcieńczeniach 1:20 i 1:40 zostały sklasyfikowane jako dodatnie. W zależności od przyjętego punktu odcięcia, rekomendowanego lub OT, odpowiednio 0% (0/12) i 58,3% (7/12) próbek pulowanych zawierających odpowiedni stosunek umiarkowanie-dodatnich próbek PF i próbek ujemnych zostało prawidłowo sklasyfikowanych (Tabela 26).

W przypadku interpretacji wyników analiz z szeregu rozcieńczeń wysoko-dodatnich próbek PF zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu, wszystkie próbki o rozcieńczeniach 1:10 zostały sklasyfikowane jako dodatnie (Tabela 26). Na podstawie interpretacji tych wyników zgodnie z OT, wszystkie próbki o rozcieńczeniach 1:10, 1:20 i 1:40 oraz dwie o rozcieńczeniu 1:80 zostały uznane za dodatnie. W zależności od przyjętego punktu odcięcia, 25% (3/12) i 91,7% (11/12) pulowanych próbek PF zostało prawidłowo sklasyfikowanych (Tabela 26).

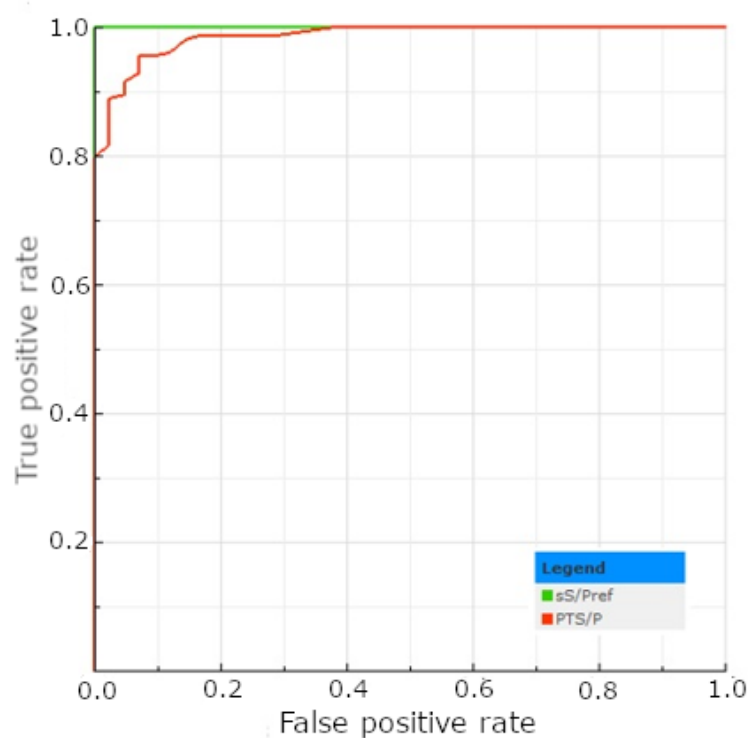
Tabela 26. Klasyfikacja szeregu rozcieńczeń nisko-, umiarkowanie- i wysoko-dodatnich próbek (zawierających przeciwciała dla IAV) w zależności od przyjętego punktu odcięcia.

Próbki	Numer próbki	Rozcieńczenie	Klasyfikacja w oparciu o R	Klasyfikacja w oparciu o OT
Nisko-dodatnie	1	1:10	0	1
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	2	1:10	0	0
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	3	1:10	0	1
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
Umiarkowanie-dodatnie	1	1:10	0	1
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	2	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
	3	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
Wysoko-dodatnie	1	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
	2	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1
	3	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy, 0 – próbka zaklasyfikowana jako ujemna, 1 – próbka zaklasyfikowana jako dodatnia

7.2.6. Przeciwciała przeciwko *Mycoplasma hyopneumoniae*

Za pomocą analizy krzywej ROC wykazano, że wyniki najbardziej zbliżone do tych uzyskanych przy pomocy złotego standardu zostaną uzyskane interpretując wyniki analiz próbek PF zgodnie z punktem odcięcia wynoszącym S/P 0,05. Klasyfikacja wyników analiz próbek PF w oparciu o ten punkt odcięcia, charakteryzowała się największą dokładnością oraz najwyższą wartością wskaźnika AUC (Ryc. 12, Tabela 27), w związku z czym, powinien być uznany za OT dla tego rodzaju próbki.



Ryc. 12. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Mhp, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Tabela 27. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Mhp, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Klasyfikator	AUC	ACC	OT
sS/Pref	1,0000	1,000	0,35
PTS/P	0,9857	0,9541	0,05

Klasyfikatory: sS/Pref - wyniki dla surowicy; PTS/P – wyniki dla płynu technologicznego.

OT obliczony przy pomocy analizy krzywej ROC wyniósł 0,05 S/P. Wartości S/P równe bądź wyższe były uznawane za dodatnie, a niższe za ujemne.

Dla wyznaczonego dla PF OT oraz zastosowanego testu ELISA wyznaczono następujące parametry walidacyjne: czułość, swoistość, PPV, NPV, dokładność oraz współczynnik κ , które zostały przedstawione w Tabeli 28.

Tabela 28. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Mhp dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Punkt odcięcia (S/P)	R	OT
	0,35	0,05
Czułość	0,65	0,99
Swoistość	0,88	0,83
PPV	0,95	0,96
NPV	0,41	0,95
Dokładność	0,70	0,95
Współczynnik κ	0,37	0,86

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy.

Zastosowanie OT przy klasyfikacji wyników próbek PF wpłynęło na poprawę wszystkich analizowanych parametrów walidacyjnych testu diagnostycznego względem tego rodzaju materiału, z wyjątkiem swoistości, która uległa nieznacznemu obniżeniu oraz spowodowało znaczący wzrost współczynnika κ , co pozwoliło na zmianę klasyfikacji zgodności z dostatecznej do doskonałej (Tabela 28). Wartość AUC obliczona dla PF była istotnie niższa w porównaniu do surowicy, ale została sklasyfikowana jako doskonała ($p < 0,05$, Ryc. 12, Tabela 27).

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w odsetku dodatnich próbek pomiędzy surowicą knurek a surowicą loszek ($p > 0,05$, Tabela 29). Przy interpretacji wyników analiz próbek PF zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu, odsetek próbek PF sklasyfikowanych jako dodatnie był istotnie niższy w porównaniu do surowic prosiąt ($p < 0,05$, Tabela 29). Interpretacja wyników analiz PF zgodnie z OT poskutkowała wzrostem odsetka próbek PF sklasyfikowanych jako dodatnie, który był porównywalny do tych odnotowanych dla surowic prosiąt ($p > 0,05$, Tabela 29).

Tabela 29. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko Mhp), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Rodzaj próbki	Dodatnie/ogółem	Odsetek dodatnich (%)	95%CI
Surowica knurek	154/196	78,57% ^a	72,31-83,74
Surowica loszka	156/209	74,64% ^a	68,33-80,06
PF R	105/196	53,57% ^b	46,59-60,42
PF OT	159/196	81,12% ^a	75,07-85,98

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy, 95% CI – 95% przedział ufności, ^{a,b} – poszczególne litery odzwierciedlają istotne statystycznie różnice, pomiędzy poszczególnymi rodzajami próbek ($p < 0,05$)

7.2.6.1. Wpływ pulowania na uzyskane wyniki

Przy interpretacji wyników analiz nisko-dodatnich, pulowanych próbek PF, według punktu odcięcia rekomendowanego przez producenta testu, wszystkie próbki, bez względu na stopień rozcieńczenia, sklasyfikowano jako ujemne względem obecności specyficznych przeciwciał przeciwko Mhp (Tabela 30). Gdy wyniki te zostały zinterpretowane z zastosowaniem OT, 2 próbki o rozcieńczeniu 1:10 zostały sklasyfikowane jako dodatnie. W zależności od przyjętego punktu odcięcia 0% (0/12) i 16,7% (2/12) rozcieńczeń nisko-dodatnich próbek PF zostało prawidłowo sklasyfikowanych (Tabela 30).

Podobnie, wszystkie badane rozcieńczenia umiarkowanie-dodatnich próbek zostały sklasyfikowane jako ujemne, gdy wyniki analiz były odczytywane zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu (Tabela 30). Na podstawie interpretacji tych wyników zgodnie z OT, wszystkie próbki o rozcieńczeniach 1:10, 1:20 i 1:40 zostały sklasyfikowane jako dodatnie. W zależności od przyjętego punktu odcięcia, 0% (0/12) i 75% (9/12) rozcieńczeń umiarkowanie-dodatnich próbek PF zostało prawidłowo sklasyfikowanych (Tabela 30).

Interpretując wyniki analiz wysoko-dodatnich, pulowanych próbek PF zgodnie z punktem odcięcia rekomendowanym przez producenta testu, wszystkie próbki o rozcieńczeniu 1:10 zostały sklasyfikowane jako dodatnie (Tabela 30). Przy interpretacji tych wyników zgodnie z OT, wszystkie analizowane próbki PF zostały uznane za dodatnie. W zależności od przyjętego punktu odcięcia, 25% (3/12) i 100% (12/12) rozcieńczeń wysoko-dodatnich próbek PF zostało sklasyfikowanych jako dodatnie (Tabela 30).

Tabela 30. Klasyfikacja szeregu rozcieńczeń nisko-, umiarkowanie- i wysoko-dodatnich próbek (zawierających przeciwciała przeciwko Mhp) w zależności od przyjętego punktu odcięcia.

Próbki	Numer próbki	Rozcieńczenie	Klasyfikacja w oparciu o R	Klasyfikacja w oparciu o OT
Nisko-dodatnie	1	1:10	0	1
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	2	1:10	0	0
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
	3	1:10	0	1
		1:20	0	0
		1:40	0	0
		1:80	0	0
Umiarkowanie-dodatnie	1	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
	2	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
	3	1:10	0	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	0
Wysoko-dodatnie	1	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1
	2	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1
	3	1:10	1	1
		1:20	0	1
		1:40	0	1
		1:80	0	1

OT – optymalny punkt odcięcia wyznaczony na podstawie krzywej ROC, R – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu dla próbek surowicy, 0 – próbka zaklasyfikowana jako ujemna, 1 – próbka zaklasyfikowana jako dodatnia

8. Dyskusja

Jak już wspomniano we wstępie pracy, aktualnie w niektórych krajach obserwowany jest trend związany z ograniczaniem przeprowadzania zabiegów obcinania ogonów u nowo narodzonych prosiąt (Gomes-Neves et al., 2024). W EU rutynowe przeprowadzanie tego zabiegu jest zabronione prawnie. W takich warunkach, jedyną możliwością otrzymywania próbek PF, będzie uzyskiwanie go od samców, które zostały poddane kastracji. To z kolei może budzić wątpliwości, co do przydatności PF uzyskanego jedynie z jąder, do celów diagnostycznych w odniesieniu do całego miotu. Dlatego, w niniejszych badaniach poddano ocenie użyteczność PF uzyskanego wyłącznie z jąder do wykrywania obecności swoistych przeciwciał oraz oznaczania wybranych parametrów immunologicznych u prosiąt oraz możliwości interpretacji uzyskanych wyników w odniesieniu do całego miotu (prosiąt obu płci). W tym celu określone zostały zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi z badania próbek surowicy loszek, surowicy knurków oraz PF. Ponadto, z uwagi na brak takich danych w piśmiennictwie, przeanalizowano zależności pomiędzy stężeniami badanych parametrów immunologicznych (Ig, cytokiny, APP) w PF, a ich stężeniami w surowicy i siarze loch (matek badanych prosiąt), aby ocenić czy wyniki uzyskane z PF mogą odzwierciedlać status immunologiczny loch w analizowanym aspekcie.

8.1. Eksperyment 1

Według najlepszej wiedzy autorów wyniki przedstawione w pracy doktorskiej są pierwszymi i jedynymi dokumentującymi stężenia wybranych Ig (IgG, IgA, IgM) oraz potwierdzającymi występowanie wraz z określeniem stężeń wybranych cytokin (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ) i APP (Hp, Pig-MAP, CRP) w PF oraz oceniającymi jego przydatność w zakresie oceny stężeń wyżej wymienionych parametrów u świń. W przypadku niektórych parametrów (IgG, IgA, IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ) zaobserwowany brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy ich stężeniami w surowicach prosiąt i PF wskazuje na przydatność PF pozyskanego wyłącznie z jąder do określania ich stężeń u prosiąt obu płci. Jednakże w przypadku innych parametrów (IgM, IL-8, Hp, Pig-MAP, CRP), takie różnice zostały zaobserwowane. Takie zjawisko może wynikać ze składu PF, który poza surowicą, zawiera także inne frakcje płynne, jak np. płyn wewnątrzkomórkowy (Nielsen i wsp., 1998). To może z kolei powodować rozcieńczanie zawartych w surowicy komponentów, w tym ocenianych wskaźników immunologicznych i wpływać na różnice w stężeniach pomiędzy surowicą, a PF.

Występowanie istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami IgA, IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ i Pig-MAP w PF i próbkach pobranych od loch wskazuje na potencjalną przydatność PF do pośredniej ich oceny także u loch. Należy także podkreślić, że na uzyskane w pracy doktorskiej wyniki z zakresu korelacji w stężeniach poszczególnych parametrów pomiędzy próbkami pobranymi od loch i próbkami pobranymi od prosiąt może wpływać niewielka liczba loch uwzględniona w eksperymencie. Dlatego, wyniki z tego obszaru powinny zostać zweryfikowane na większej liczbie loch.

Z uwagi na brak danych literaturowych obejmujących cel niniejszego eksperymentu, nie ma możliwości zestawienia otrzymanych wyników z wynikami uzyskanymi w analogicznych badaniach. W celu uzyskania wyników służących do zweryfikowania hipotez pracy doktorskiej, przeprowadzono szereg analiz, które poskutkowały uzyskaniem danych udokumentowanych uprzednio w literaturze, jak stężenia poszczególnych parametrów immunologicznych w surowicach prosiąt i loch oraz siarze, czy występowanie korelacji między stężeniami Ig w różnych typach próbek. Z racji tego, że w niektórych przypadkach zaobserwowano rozbieżności w omawianym zakresie pomiędzy wynikami uzyskanymi w pracy doktorskiej, a tymi dostępnymi w literaturze, postanowiono uwzględnić w dyskusji także powyższe kwestie. Jak już wcześniej wspomniano, porównywanie wartości uzyskiwanych w poszczególnych doświadczeniach może być problematyczne, chociażby z uwagi na różnice w układach doświadczeń, rodzaju wykorzystywanych zwierząt, czy metod diagnostycznych użytych w badaniach.

8.1.1. Immunoglobuliny

Ig stanowią najdokładniej przebadany składnik MDI u świń. Dostępnych jest szereg prac, które określają stężenia poszczególnych klas przeciwciał w surowicy loch i nowo narodzonych prosiąt oraz w siarze (Curtis and Bourne i wsp., 1970; Klobasa i wsp., 1981; Klobasa i wsp., 1986; Klobasa i wsp., 1987; Bland i wsp., 1999; Markowska-Daniel i wsp., 2010; Markowska-Daniel i Pomorska-Mól, 2010; Bandrick i wsp., 2014; Maciag i wsp., 2022). Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej stanowią pierwsze doniesienie na temat oznaczania stężeń przeciwciał różnych klas w PF. Uzyskane wyniki potwierdziły, że wszystkie badane klasy Ig były obecne w PF.

Brak istotnych statystycznie różnic w stężeniach IgG i IgA pomiędzy próbkami pobranymi od prosiąt (surowica loszek, surowica knurów i PF) wskazuje na przydatność PF uzyskanego wyłącznie z jąder do określania stężeń tych klas Ig i odnoszenia wyników do całego miotu (knurków i loszek). W przypadku IgM stwierdzono istotne różnice pomiędzy jej stężeniem w surowicach prosiąt i PF, co wskazuje na brak przydatności PF do określania stężeń tej klasy przeciwciał u prosiąt w wieku do 7 dni. Niemniej, IgM stanowi klasę przeciwciał o najniższym poziomie stężeń w surowicy nowonarodzonych prosiąt (Klobasa i wsp., 1981; Markowska-Daniel i wsp., 2010), tak więc jej znaczenie we wczesnej ocenie statusu immunologicznego jest mniejsze w porównaniu do IgG, dominującej klasy przeciwciał w surowicy prosiąt, chroniącej przed infekcjami ogólnoustrojowymi lub drugiej pod względem stężeń IgA, która z kolei pełni istotną rolę w odporności lokalnej, związanej z błonami śluzowymi (Klobasa i wsp., 1981; Janeway i wsp., 2001; Markowska-Daniel i wsp., 2010). Reasumując, na podstawie otrzymanych wyników należy stwierdzić, że PF stanowi obiecującą alternatywę dla krwi do oceny stężeń IgG oraz IgA u prosiąt ssących.

Wyniki analiz korelacji stężeń poszczególnych klas immunoglobulin pomiędzy różnymi rodzajami materiałów wskazują z kolei, że w przypadku IgA, PF może być potencjalnie przydatny do szacowania jej zawartości w surowicy matek prosiąt ssących, z uwagi na zaobserwowaną dodatnią korelację ($p < 0,05$) między tymi próbkami. Jednakże, należy podkreślić, że związek pomiędzy stężeniem IgA w surowicy loch i PF był słaby oraz nie zaobserwowano takiej zależności pomiędzy surowicą knurków a surowicą loch, co może wynikać z niskiej liczebności przebadanych loch. Z tego względu, konieczne są w tym zakresie dalsze badania, które obejmować powinny większą liczbę loch.

Jak już wspomniano, siara stanowi główne źródło MDA dla prosiąt (Klobasa i wsp., 1981). Dostępne dane dotyczące zależności pomiędzy stężeniem przeciwciał w surowicy prosiąt a ich stężeniem w siarze są niejednoznaczne. Część z nich jest zgodna z przedstawionymi w niniejszej pracy wynikami, gdzie nie zaobserwowano związku pomiędzy stężeniami MDA w surowicy prosiąt i siarze (Frenyó i wsp., 1981; Markowska-Daniel i wsp., 2010), podczas gdy inne prace wskazują na występowanie takiej zależności (Devillers i wsp., 2011; Kielland i wsp., 2015). Brak związku może wynikać z dawki pobranej przez prosięta siary, która dostarcza immunoglobulin w ilości przekraczającej możliwości ich transferu przez ścianę jelit (Frenyó i wsp., 1981;

Markowska-Daniel i wsp., 2010; Campbell i wsp., 2012). Według Rooke i Bland (2002), stężenie IgG w surowicy prosiąt przestaje wzrastać po spożyciu przez prosięta około 200 g siary. Wykazano, że wśród prosiąt, które pobierały poniżej 200 g siary śmiertelność wynosiła 43,4%, podczas gdy wśród prosiąt, które spożyły przynajmniej 200 g siary współczynnik znacząco spadał, do 7,1%, co sugeruje, że 200 g siary to minimalna ilość jaką muszą spożyć prosięta w celu redukcji ryzyka wczesnych upadków, natomiast średnie spożycie siary przez prosięta zostało oszacowane na około 300 g (Devillers i wsp., 2007; Cabrera i wsp., 2012). Tak więc, pobrana przez prosięta siara może dostarczać Ig w ilościach przekraczających możliwości transferu przez ścianę jelita i stąd może wynikać opisany brak korelacji. Podobnie wygląda kwestia dotycząca stężenia Ig zawartych w siarze - według Kielland i wsp. (2015) zawartość IgG w siarze na poziomie 60 g/l powoduje zahamowanie dalszego wzrostu stężenia tej Ig w surowicy prosiąt. Devillers i wsp. (2011) wskazuje, że zawartość IgG w surowicy prosiąt osiąga *plateau* po spożyciu około 15 g tej klasy przeciwciał. Na brak związku pomiędzy stężeniami Ig w siarze i surowicy prosiąt mogą wpływać także inne czynniki, które warunkują stężenie Ig w surowicy prosiąt, jak m.in. wielkość miotu, kolejność urodzenia prosięcia, jego wskaźnik masy ciała (ang. *body mas index*; BMI), żywotność itd. (Markowska-Daniel i wsp., 2010; Kielland i wsp., 2015). W badaniu Markowskiej-Daniel i wsp. (2010) zaobserwowano negatywną zależność pomiędzy stężeniem Ig w surowicy prosiąt a wielkością miotu. W innym badaniu takiej zależności nie zaobserwowano, ale odnotowano, że wielkość miotu może mieć wpływ na ilość spożytej przez prosięta siary oraz że kolejność prosięcia w danym miocie, była istotnie powiązana ze stężeniem IgG w surowicy (Kielland i wsp., 2015). Autorzy konkludują, że zjawisko to nie jest wynikiem samej wielkości miotu, a czasu, który upływa od momentu rozpoczęcia akcji porodowej a spożyciem siary i związanym z tym spadkiem stężenia MDA w siarze (Kielland i wsp., 2015). Niejednoznaczne są dane dotyczące wpływu masy urodzeniowej prosiąt na stężenia IgG w ich surowicy. Devillers i wsp. (2011) wskazuje, że słabe prosięta, np. z niską masą urodzeniową, pobierają mniej IgG wraz z siarą, co prawdopodobnie wynika z mniejszego/późniejszego przyjęcia siary. W innej z dostępnych prac wykazano, że BMI w dniu urodzenia ma wpływ na stężenie tej klasy przeciwciał w surowicy prosiąt, gdyż prosięta o wskaźniku BMI równym lub niższym 17kg/m² nie były wystarczająco silne by pobrać odpowiednie ilości siary i w związku z tym wystarczającą ilość IgG (Kielland i wsp., 2015), podczas gdy w kolejnej, masa urodzeniowa prosiąt nie miała wpływu na stężenia IgG w surowicy

(Cabrera i wsp., 2012). Jednakże w doświadczeniu Cabrera i wsp. (2012) każdemu z prosiąt udzielano pomocy w dotarciu do sutka i ssaniu, co niewątpliwie wpłynęło na otrzymany wynik. Należy także wspomnieć, że brak występowania korelacji w stężeniach IgA i IgM pomiędzy siarą a próbkami pobranymi od prosiąt może być wynikiem krótkiego okresu półtrwania tych klas przeciwciał w surowicy, który według jednego z badań wynosi odpowiednio 2 i 3 dni (Klobasa i wsp., 1981).

Otrzymane wyniki były, w zakresie dostępnych danych, co do zasady zgodne z opisanymi we wcześniejszych publikacjach, tj. zaobserwowano analogiczne wzorce stężeń poszczególnych klas przeciwciał w badanych materiałach, gdzie dominującą klasą przeciwciał we wszystkich rodzajach próbek była IgG, a najniższe stężenia w każdym z analizowanych rodzajów materiałów, z wyjątkiem surowicy loch, odnotowano dla IgM. Podobne zależności potwierdzono dla PF.

Zaobserwowane w niniejszym eksperymencie średnie wartości stężeń poszczególnych klas Ig w różnych typach próbek różniły się od wartości podawanych w dostępnej literaturze i w zależności od publikacji były bardziej lub mniej zbliżone (Klobasa i wsp., 1981; Klobasa i wsp., 1986; Markowska-Daniel i wsp., 2010; Kielland i wsp., 2015). Występowanie różnic w stężeniach przeciwciał pomiędzy poszczególnymi osobnikami jest zjawiskiem naturalnym, na które wpływ może mieć wiele czynników. Dodatkowo, należy wziąć pod uwagę, że wpływ na zaobserwowane wyniki może mieć także metoda oznaczania – najbliższe wartości do tych, z niniejszego eksperymentu zaobserwowano w pracy, gdzie do oznaczania stężeń przeciwciał zastosowano metodę ELISA (Markowska-Daniel et al., 2010).

8.1.2. Cytokiny

Liczba prac dotycząca transferu cytokin zawartych w siarze loch w ramach MDI jest niewielka. Wykrycie w siarze i surowicy prosiąt analizowanych cytokin jest zgodne, z wcześniejszymi doniesieniami (Nguyen i wsp., 2007; Maciag i wsp., 2022). Niniejsza praca jest pierwszą potwierdzającą występowanie i oceniającą stężenia IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 i IFN- γ w PF.

Brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy stężeniami IL-1 β , IL-4, IL-6 i IFN- γ w surowicach prosiąt obu płci i w PF wskazuje na przydatność PF uzyskanego wyłącznie z jąder do określania stężeń tych parametrów u prosiąt i odnoszenia wyników do całego miotu (obu płci). Występowanie takiej różnicy pomiędzy surowicami prosiąt a PF

w odniesieniu do IL-8 wskazuje na ograniczoną przydatność PF do określania stężeń tej klasy cytokin w krążeniu ogólnym prosiąt.

Zaobserwowane dodatnie korelacje, o sile od umiarkowanej do bardzo silnej, pomiędzy stężeniami IL-1 β , IL-4, IL-6 oraz IFN- γ w próbkach pobranych od loch i w PF wskazują na potencjalną przydatność PF do szacowania stężeń tych parametrów u matek. W przypadku IL-8 taka zależność została zaobserwowana wyłącznie pomiędzy PF a surowicą loch, a jej siła nie wskazywała na występowanie związku liniowego, w związku z czym, PF nie wydaje się przydatny do określania stężenia tej cytokiny u loch. Występowanie korelacji pomiędzy stężeniami IL-1 β , IL-4, IL-6 oraz IFN- γ w surowicach prosiąt i próbkach pobranych od loch, w połączeniu z brakiem możliwości endogennej syntezy większości tych cytokin przez nowo narodzone prosię oraz brakiem możliwości ich transferu przez łożysko wskazuje, że siara stanowi ich główne źródło, a wzorce ich stężeń w krążeniu prosiąt będą analogiczne do tych występujących u ich matek.

Wyniki analiz IL-8 odbiegają od wyników obserwowanych w przypadku pozostałych analizowanych cytokin. Jej stężenie w siarze wielokrotnie przewyższało jej stężenia w surowicy prosiąt i loch. Zjawisko to może sugerować, że większość tej cytokiny znajdująca się w siarze lochy jest produkowana lokalnie w gruczole mlekowym. U człowieka, najwyższe stężenie IL-8 w wydzielinie gruczołu mlekowego są odnotowywane w ciągu 1 dnia po porodzie, po czym dochodzi do jej gwałtownego spadku. Wykazano także, że cytokina ta jest produkowana przez komórki nabłonka gruczołu mlekowego oraz komórki zawarte w siarze, również bez wcześniejszej stymulacji (Hashira i wsp., 2002). Biorąc pod uwagę powyższe, można założyć, że takie zjawisko występuje także u świń. Potencjalną przyczyną występowania istotnej statystycznie, ujemnej korelacji pomiędzy stężeniem IL-8 w surowicy prosiąt i siarze, może być jej znacznie wyższe stężenie w siarze, w połączeniu z jej krótkim okresem półtrwania.

Uzyskane wyniki w zakresie stężeń analizowanych cytokin w różnych typach próbek w pewnym stopniu odbiegają od wyników dostępnych w literaturze. Dla przykładu, w badaniu Nguyen i wsp. (2007) dominującymi klasami cytokin w surowicy i siarze lochy w okresie okołoporodowym były IL-4 oraz TGF- β , podczas gdy w niniejszym eksperymencie średnie stężenie IL-4 w próbkach pobranych od loch było niższe od

IFN- γ , IL-1 β i IL-6. Należy zaznaczyć, że profil cytokinowy organizmu może ulegać wahaniom. Zaobserwowana różnica może wynikać z warunków utrzymania zwierząt w obu doświadczeniach. W ramach pracy doktorskiej próbki były pobierane od zwierząt utrzymywanych w warunkach fermowych, podczas gdy w pracy Nguyen i wsp. (2007) nie podano dokładnych informacji odnośnie sposobu utrzymywania zwierząt (warunki laboratoryjne vs. fermowe). IL-4 i TGF- β są produkowane przez inne typy komórek (Th2, Th3) niż IFN- γ (Th1), w reakcji na działanie innych czynników oraz wywierają efekt na inne rodzaje komórek (Nguyen i wsp., 2007). IL-4 i IFN- γ są uznawane za cytokiny o działaniu antagonistycznym (Nguyen i wsp., 2007; Abbas i wsp., 2019). Zatem, obserwowane zmiany mogą wynikać z potencjalnych różnic w warunkach utrzymania zwierząt i czynników na nie oddziałujących. Ponadto, IFN- γ , IL-1 β i IL-6 są cytokinami prozapalnymi, natomiast IL-4 i TGF- β należą do cytokin o działaniu przeciwzapalnym (Liu i wsp., 2021). W warunkach terenowych narażenie organizmu na czynniki mogące wywoływać stan zapalny jest zdecydowanie wyższe, w porównaniu do kontrolowanych warunków w układzie doświadczalnym, co może tłumaczyć zaistniałe rozbieżności. W niniejszym eksperymencie w surowicy loch wykryto obecność TNF- α , czyli cytokiny również klasyfikowanej jako prozapalnej (Liu i wsp., 2021), podczas, gdy była ona nieobecna w surowicy loch w doświadczeniu Nguyen i wsp. (2007), co wspiera powyższe wytłumaczenie. Podobnie wzorce stężeń w surowicy prosiąt zaobserwowane w niniejszym i wcześniejszym (Nguyen i wsp., 2007) eksperymencie były rozbieżne i naśladowały te występujące u matek. Zjawisko to jest zrozumiałe i wynika z faktu, że endogenna produkcja cytokin przez prosięta została potwierdzona jedynie w odniesieniu do IL-12 i TGF- β 1, a zatem MDI jest dla nich jedynym ich źródłem (Nguyen i wsp., 2007). Nasze wyniki dotyczące braku obecności TNF- α w surowicy prosiąt są tożsame z wynikami uzyskanymi przez Nguyen i wsp. (2007), ale różnią się od wyników przedstawionych przez innych autorów (Llamas Moya i wsp., 2005; Maciag i wsp., 2022). W doświadczeniu Maciag i wsp. (2022), TNF- α został wykryty w surowicy prosiąt w 24 godzinie życia. Co istotne, jego stężenie było istotnie wyższe w krążeniu prosiąt, które zostały odpoicone siarą wieloródek, zawierającą istotnie wyższe stężenia TNF- α w porównaniu do siary pierwiastek (Maciag i wsp., 2022). Stężenia TNF- α w siarze pierwiastek w przywoływanej pracy ($0,077 \pm 0,027$ ng/ml) były zbliżone do wartości zaobserwowanych w pracy doktorskiej. Obserwowane różnice są zatem zrozumiałe i najprawdopodobniej są rezultatem krótkiego okresu półtrwania tej cytokiny w połączeniu z jej niską zawartością w siarze (Nguyen i wsp., 2007; Liu i wsp., 2021).

Odmienne wyniki zostały uzyskane w doświadczeniu Llamas Moya i wsp. (2007), w którym stężenie TNF- α w surowicy prosiąt było powyżej granicy wykrywalności od 1 do 7 dnia życia, ze szczytem przypadającym na 5 dzień życia (200-250 ng/ml). Niemniej, w doświadczeniu nie przeprowadzano oznaczania stężenia tej cytokiny w siarze, co mogłoby w dużej mierze tłumaczyć obserwowane zjawisko. Autorzy badania sugerują, że obserwowany wzrost stężenia TNF- α może być również spowodowany dojrzewaniem komórek i funkcji odpornościowych (Llamas Moya i wsp., 2007). W pracy Maciag i wsp. (2022) zaobserwowano związek pomiędzy większą skłonnością do rozwoju wrodzonych reakcji zapalnych i przeciwzapalnych oraz specyficznych odpowiedzi typu T1 i T2 u prosiąt w okresie okołoporodowym a pobieraniem siary loch, która zawierała istotnie wyższe stężenia większości analizowanych składników MDI.

8.1.3. Białka ostrej fazy

Wykrycie w siarze i surowicy prosiąt Hp, CRP i Pig-MAP jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Martin i wsp., 2005; Hiss-Pesch i wsp., 2011; Werner i wsp., 2014). Niniejsza praca jest pierwszą, w której potwierdzono występowanie i oznaczono stężenia Hp, Pig-MAP i CRP w PF.

Brak istotnych różnic pomiędzy średnimi stężeniami Hp w surowicy knurków i PF sugeruje potencjalną przydatność PF do oceny stężenia tego parametru u knurków w okresie neonatalnym. Pomimo braku istotnej różnicy pomiędzy średnimi stężeniami tego APP w surowicy knurków i loszek, taka różnica została zaobserwowana pomiędzy jego średnimi stężeniami w surowicy loszek i PF. Powyższe wskazuje na ograniczoną przydatność PF uzyskanego wyłącznie z jąder do oceny średniego stężenia Hp w obrębie całego miotu.

Brak istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem Hp w surowicy loch i PF oraz występowanie korelacji o sile sugerującej brak związku liniowego pomiędzy stężeniem tego APP w siarze i PF, wskazuje na brak przydatności PF do oceny stężeń Hp u matek prosiąt ssących.

Siara stanowi pierwsze źródło Hp dla nowo narodzonego prosięcia i stymuluje ekspresję matrycowego kwasu rybonukleinowego (ang. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) Hp w wątrobie (Hiss-Pesch i wsp., 2011). Dostępne dane wskazują, że stężenie Hp w surowicy prosiąt przed pobraniem siary jest bliskie zeru, a u prosiąt karmionych preparatem mlekozastępczym nie obserwowano wzrostu ekspresji mRNA Hp w wątrobie,

tak jak miało to miejsce u prosiąt pobierających siarę (Hiss-Pesch i wsp., 2011). Mechanizm uruchamiania endogennej ekspresji mRNA Hp u nowonarodzonego prosięcia nie jest poznany, ale podejrzewa się, że rolę w tym procesie mogą odgrywać zawarte w siarze cytokiny np. IL-6 (Hiss-Pesch i wsp., 2011). Występowanie jedynie słabej korelacji pomiędzy stężeniem Hp w surowicy loszek i siarze i brak zależności liniowej pomiędzy jej stężeniem w surowicy knurków i siarze może zatem wynikać z dość wczesnej ekspresji mRNA Hp w wątrobie prosiąt, która, jak zaobserwowano, znacząco wzrasta u prosiąt, które pobrały siarę w 9 i 12 godzinie życia (Hiss-Pesch i wsp., 2011).

Dostępne dane dotyczące średnich stężeń Hp w surowicy prosiąt w trakcie pierwszych dni życia są zróżnicowane. Wyniki średnich wartości stężeń Hp w surowicy prosiąt uzyskane w niniejszym eksperymencie, różniły się od średnich wartości tego BOF zaobserwowanych w surowicy prosiąt w 9 godzin po urodzeniu ($271 \pm 48,6 \mu\text{g/ml}$) i były bardziej zbliżone do wartości odnotowanych w surowicy prosiąt w 7 i 14 dniu życia (Hiss-Pesch i wsp., 2011; Pomorska-Mól i wsp., 2012a). Badania wskazują, że wartości Hp w surowicy prosiąt wzrastają w ciągu pierwszego tygodnia życia, a minimalne i maksymalne jego stężenie w tym okresie przypada na odpowiednio ~1 i 7 dzień życia, co może tłumaczyć zaobserwowane rozbieżności (Martin i wsp., 2005; Llamas Moya i wsp., 2007). Niemniej, średnie wartości stężeń Hp w surowicy prosiąt odnotowane w naszych badaniach różniły się od obserwacji Llamas Moya i wsp. (2007) ($0,6 \text{ ng/ml}$), którzy w swoich badaniach wykorzystali prosięta w zbliżonym wieku. Co istotne, badania te wskazują, że procedury takie jak skracanie ogonków mogą wpływać na wzrost stężenia Hp w surowicy prosiąt (Llamas Moya i wsp., 2007). Jednakże stężenia Hp w surowicy prosiąt w 3 i 5 dniu życia poddanych wyżej wymienionym procedurom w dalszym ciągu pozostawały dużo niższe ($0,7 \text{ ng/ml}$) w porównaniu do wartości uzyskanych przez nas (Llamas Moya i wsp., 2007). W dwóch kolejnych publikacjach, wartości stężeń Hp w surowicy prosiąt utrzymywanych w warunkach terenowych, w 6 i 7 dniu życia wynosiły odpowiednio $1,3 \text{ mg/ml}$ i $0,63 \text{ mg/ml}$ (Martin i wsp., 2005; Pomorska-Mól i wsp., 2012a). Zaobserwowane rozbieżności mogą być zatem wynikiem prowadzenia badań w odmiennych warunkach. Próbkę wykorzystane w naszych badaniach były pobierane od zwierząt utrzymywanych w warunkach fermowych, które są bardziej podatne na rozwój różnych stanów zapalnych oraz przebywają w mniej kontrolowanych warunkach otoczenia. Przykładowo, w doświadczeniu Hennig-Pauka

i wsp. (2019), mimo tego że autorzy wskazują, że nie można jednoznacznie określić czy poziom pyłu w pomieszczeniach inwentarskich wpływa na wzrost Hp w surowicy (ze względu na jednoczesny wpływ innych czynników jak np. pora roku), zaobserwowano wzrost stężenia Hp w surowicy prosiąt utrzymywanych w większym zapyleniu. Można zatem zakładać, że za występowanie zaobserwowanych zmian mogą odpowiadać warunki, w jakich zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach były utrzymywane.

Istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniami Pig-MAP w surowicach prosiąt obu płci, a PF, sugerują brak przydatności PF pozyskanego wyłącznie z jąder do oceny stężenia tego APP u prosiąt ssących bez względu na ich płeć.

Istotna statystycznie, dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem Pig-MAP w PF i siarze wskazuje na potencjalną przydatność PF pozyskanego wyłącznie z jąder do pośredniej oceny stężenia tego parametru w wydzielinie gruczołu mlekowego matek. Jednakże należy podkreślić słabą siłę tego związku. Biorąc pod uwagę powyższe oraz niewielką liczbę loch uwzględnioną w eksperymencie, dalsze badania uwzględniające większą liczbę loch są konieczne, celem weryfikacji.

Umiarkowane, dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem Pig-MAP w siarze i w surowicy prosiąt są zbieżne z doniesieniami sugerującym, że to siara, przynajmniej w pewnym stopniu, jest źródłem tego BOF dla nowo narodzonych prosiąt (Martin i wsp., 2005). Stężenie Pig-MAP w surowicy prosiąt po urodzeniu przed pobraniem siary jest na minimalnym poziomie i zaczyna wzrastać po pobraniu siary, przy czym maksymalne stężenie w ciągu pierwszego tygodnia życia jest osiągane w 4 dniu (Martin i wsp., 2005). Analiza Western blot surowicy prosiąt w 4 dniu życia z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko Pig-MAP wykazała obecność prążków o długości około 120, 110, 95 i 36 kDa, więc analogicznych jak w przypadku siary (Martin i wsp., 2005). Wszystkie te dane zdają się potwierdzać, że siara stanowi źródło Pig-MAP dla nowonarodzonych prosiąt.

Wykrycie Pig-MAP w surowicy nowo narodzonych prosiąt potwierdza wcześniejsze doniesienia (Martin i wsp., 2005). Wyniki badań Martin i wsp. (2005) wskazują wyższe średnie wartości stężeń Pig-MAP w surowicy prosiąt w analogicznym wieku od wartości zaobserwowanych w niniejszym doświadczeniu. Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być różny status zdrowotny stad, z których pochodziły badane prosięta, jako, że stado

wykorzystane w niniejszym doświadczeniu charakteryzowało się wyższym statusem zdrowotnym, w porównaniu do stada wykorzystanego w cytowanej publikacji (Martin i wsp., 2005). Na korzyść tego wyjaśnienia może świadczyć fakt, że średnie wartości stężeń Pig-MAP u prosiąt w wieku 7 dni, pochodzących ze stada o podobnym statusie zdrowotnym do tego wykorzystanego w niniejszym doświadczeniu (Pomorska-Mól i wsp., 2011), były porównywalne do wartości zaobserwowanych w pracy doktorskiej.

Z uwagi na istotne różnice pomiędzy stężeniami CRP w surowicy loszek i knurków oraz między surowicami prosiąt a PF, PF uzyskany wyłącznie z jąder nie może być rozpatrywany jako obiecująca alternatywa do oceny stężeń tego APP w miocie.

Z uwagi na brak istotnych korelacji pomiędzy stężeniami CRP w próbkach pobranych od loch i PF, PF nie stanowi także obiecującej alternatywy do oceny stężeń tego BOF u loch.

Istotna statystycznie, dodatnia korelacja pomiędzy próbkami pobranymi od loch i od prosiąt została zaobserwowana jedynie pomiędzy stężeniem CRP w surowicy loch i loszek, jednakże należy podkreślić, że była ona słaba. Brak korelacji pomiędzy stężeniem CRP w siarze i surowicy prosiąt jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami (Werner i wsp., 2014). Brak jest danych dotyczących stężeń CRP w surowicy nowo narodzonych prosiąt przed pobraniem siary. Werner i wsp. (2014) sugeruje, że CRP zawarte w surowicy prosiąt w 4 dniu życia pochodzi z siary. W badaniu Llamas Moya i wsp. (2007) stężenie CRP w ciągu pierwszego tygodnia życia utrzymywało się u prosiąt na relatywnie stałym poziomie. U człowieka, okres półtrwania CRP jest dosyć krótki i jest szacowany na około 19 godzin, po czym jego stężenie w surowicy zaczyna gwałtownie się obniżać, chyba, że następuje jego ciągła produkcja (Coventry i wsp., 2009). U świń, CRP jest białkiem, które gwałtownie wzrasta w skutek zadziałania bodźca wywołującego stan zapalny, przy czym jego stężenia również nie utrzymują się na wysokich poziomach przez dłuższy czas. Brak korelacji pomiędzy stężeniami CRP w próbkach pobranych od loch i surowicy prosiąt pobranej między 3 a 7 dniem życia, przy jednoczesnym relatywnie stałym poziomie tego białka w surowicy prosiąt może sugerować jego endogenną produkcję przez prosięta.

8.2. Eksperyment 2

Pomimo tego, że pierwsze doniesienia dotyczące potencjalnego zastosowania PF w diagnostyce i monitoringu chorób świń pochodzą z 2010 roku (Boettcher i wsp., 2010), to w porównaniu do innych alternatywnych próbek, które można uzyskiwać od świń (np. OF, MJ), możliwości wykorzystywania PF w praktyce są wciąż dosyć słabo zbadane, m.in. wciąż brakuje dostępnych komercyjnych testów ELISA, które byłyby dedykowane do badania PF. W takiej sytuacji, w przypadku chęci wykorzystywania w laboratoriach diagnostycznych PF jako materiału diagnostycznego, jedyną możliwością jest korzystanie z testów opracowanych i walidowanych dla innych typów próbek (głównie krwi i surowicy). W przypadku komercyjnych testów ELISA, materiałem diagnostycznym rutynowo wykorzystywanym do przeprowadzenia tego typu badania, jest surowica. Takie rozwiązanie może mieć jednak pewne ograniczenia. Należy mieć na uwadze, że testy walidowane dla jednego typu materiału diagnostycznego, mogą być nieodpowiednie do wykorzystywania innych typów próbek, co może skutkować otrzymywaniem wyników fałszywych. Może to wynikać z odmiennego składu poszczególnych typów materiałów diagnostycznych, występowania reakcji niespecyficznych lub nieprzewidzianych interakcji na różnym poziomie. Dla przykładu, MJ, uzyskiwany poprzez zamrożenie i rozmrożenie wycinka tkanki mięśniowej, zawiera w swoim składzie, poza krwią, dodatkowe komponenty, jak limfę i płyn wewnątrzkomórkowy (Nielsen i wsp., 1998). W badaniu Nielsen i wsp. (1998) zaobserwowano około 10 krotnie większe rozcieńczenie specyficznych przeciwciał w MJ w porównaniu do surowicy i zasugerowano, że MJ może stanowić fizjologiczne rozcieńczenie surowicy. Jednakże w tym samym badaniu wykazano zgodność wyników otrzymywanych w badaniu ELISA, pomiędzy badanymi próbkami surowicy i MJ, gdy zastosowano w odniesieniu do MJ odpowiednie rozcieńczenie (Nielsen i wsp., 1998). Zasugerowano także, że trafność otrzymanych w niniejszym teście wyników, może być poprawiona poprzez zmianę punktu odcięcia (Nielsen i wsp., 1998). Na podstawie definicji PF, który jest opisywany jako surowiczo-krwisty płyn pozyskany z tkanek (jader/obciętych ogonów) (Lopez i wsp., 2018; Magtoto i wsp., 2022), można zakładać, że jego skład jest dość zbliżony do składu surowicy. Zatem należy przypuszczać, że przynajmniej niektóre z komercyjnie dostępnych testów ELISA walidowanych dla surowicy, będą mogły być zastosowane także w badaniu próbek PF. Jednakże nie można wykluczyć, podobnie jak w przypadku MJ, że w skład PF będą wchodziły także inne

komponenty, które mogą interferować ze składnikami testu i prowadzić do uzyskania wyników fałszywych (Nielsen i wsp., 1998; Di Bartolo i wsp., 2020). Stąd, przy wykorzystaniu do badań próbek PF testów walidowanych dla innych rodzajów próbek, wskazanym jest przeprowadzenie oceny ich przydatności i ewentualnie wprowadzenie niezbędnych modyfikacji do metodyki ich wykonania lub interpretacji np. dobranie odpowiedniego rozcieńczenia lub wyznaczenie optymalnego dla PF punkt odcięcia, aby uzyskane wyniki odzwierciedlały stan faktyczny próbek.

Do oceny testów diagnostycznych stosuje się szereg parametrów walidacyjnych. Do najpowszechniejszych zalicza się: czułość, swoistość, PPV, NPV oraz dokładność. Idealny test diagnostyczny powinien wykazywać wysokie wartości wszystkich parametrów walidacyjnych. Niestety w praktyce osiągnięcie takiej równowagi może być trudne. Czułość i swoistość są miarami, które wskazują zdolność testu do prawidłowego zaklasyfikowania zwierzęcia jako chorego lub zdrowego (w szerszym ujęciu posiadającego lub nie daną cechę). Czułość opisuje zdolność testu do prawidłowego sklasyfikowania zwierzęcia chorego, jako dodatnie. Testy o wysokiej czułości będą się charakteryzowały niskim odsetkiem wyników fałszywie ujemnych. Z kolei swoistość opisuje zdolność testu diagnostycznego do prawidłowego sklasyfikowania zwierzęcia zdrowego, jako ujemne. Jeśli dany test charakteryzuje się wysoką swoistością, to będzie dawał niski odsetek wyników fałszywie dodatnich. Najlepszym rozwiązaniem jest stosowanie testów, które posiadają możliwie wysokie oba te wskaźniki. Niestety często wzrost jednego z tych parametrów, będzie skutkował obniżeniem drugiego. W zależności od celu w jakim wykonywany jest dany test, testy diagnostyczne można podzielić na trzy kategorie: przesiewowe (ang. *screening*), potwierdzające i wykluczające (Feinstein, 1975). Do monitoringu stanu zdrowia stad świń wybiera się testy przesiewowe. Takie testy, powinny cechować się możliwe wysokimi parametrami czułości i swoistości. W przypadku testowania względnie zdrowej grupy zwierząt, do otrzymanych dodatnich wyników testów przesiewowych powinno podchodzić się z pewną rezerwą i powinny one zostać zweryfikowane za pomocą testów potwierdzających (Zeman, 1997; Maxim i wsp., 2019). Wartości predykcyjne testów, zależą od czułości, specyficzności i od częstości występowania choroby/cechy w badanej grupie zwierząt. Świadczą zatem o „wiarygodności” dostarczanych przez test wyników. W przypadku gdy PPV jest wysoka, to dodatnie wyniki testu są z reguły dokładne, ale wyniki ujemne mogą być kwestionowane. Jeżeli choroba/cecha w badanej grupie zwierząt występuje rzadko, to

wartość predykcyjna testu będzie niska, niezależnie od dokładności testu. W przypadku wysokiej NPV, ujemne wyniki testu będą na ogół dokładne, podczas gdy wyniki dodatnie mogą być kwestionowane (Zeman, 1997; Monaghan i wsp., 2021).

Wykorzystane w niniejszym eksperymencie komercyjne testy ELISA, w odniesieniu do PF charakteryzowały się wysokimi wartościami swoistości i PPV. Jednakże, gdy otrzymane wyniki analiz PF były interpretowane według punktu odcięcia rekomendowanego przez producenta testu, to czułość, NPV oraz współczynnik κ były niezadawalające. Wyznaczenie za pomocą krzywej ROC optymalnego dla PF punktu odcięcia i interpretacja wyników zgodnie z nim, pozwoliła w odniesieniu do części wykorzystanych testów na poprawę w zakresie omawianych parametrów. W przypadku testu służącego do wykrywania swoistych przeciwciał przeciwko Mhp, interpretacja uzyskanych wyników według optymalnego dla PF punktu odcięcia, znacząco poprawiała prawie wszystkie analizowane parametry walidacyjne testu, do blisko idealnych wartości, skutkując znakomitą dokładnością i zgodnością. Powyższe, w połączeniu z wyliczoną dla PF doskonałą wartością AUC wskazuje na przydatność tego testu do wykrywania swoistych przeciwciał w PF, po wyznaczeniu i wprowadzeniu modyfikacji w zakresie punktu odcięcia. Podobną prawidłowość zaobserwowano w przypadku testu służącego do wykrywania swoistych przeciwciał przeciwko IAV. Interpretacja wyników analizy próbek PF według OT skutkowałą wzrostem niesatysfakcjonujących uprzednio czułości, NPV i współczynnika κ , przy jednoczesnym tylko nieznacznym obniżeniu pozostałych parametrów, co w rezultacie dało doskonałą dokładność i zgodność. W połączeniu z wyliczoną dla PF wartością AUC, która nie różniła się istotnie statystycznie od standardu, wskazuje to na przydatność tego testu do wykrywania obecności swoistych przeciwciał w PF, po wyznaczeniu i zastosowaniu optymalnego dla tej próbki punktu odcięcia. Test służący do wykrywania swoistych przeciwciał przeciwko PEDV charakteryzował się doskonałą dokładnością, nawet w sytuacji gdy wyniki były analizowane w oparciu o punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu. Jednakże należy podkreślić, że w tym przypadku odsetek próbek sklasyfikowanych jako dodatnie był niski, bez względu na rodzaj badanej próbki, a wiadomo, że dokładność testu diagnostycznego zależy od prevalencji (Faizi i Alvi, 2023). Interpretacja uzyskanych wyników według optymalnego dla PF punktu odcięcia spowodowała znaczącą poprawę niesatysfakcjonującej wcześniej czułości oraz reklasyfikację współczynnika κ z umiarkowanego do znaczącego, przy zauważalnym obniżeniu PPV. Powyższe dane,

w połączeniu z brakiem istotnej statystycznie różnicy pomiędzy AUC wyliczonym dla PF a standardem, sugerują, że test ten może być użyteczny do wykrywania swoitych przeciwciał w PF. W przypadku testu służącego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko HEV, interpretacja wyników w oparciu o optymalny dla PF punkt odcięcia spowodowała znaczący spadek swoistości, co rodzi ryzyko uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich. Wzrost zgodności był jedynie nieznaczny i nie spowodował zmiany jej klasyfikacji. Jednakże biorąc pod uwagę doskonałą czułość, dokładność oraz akceptowalny poziom pozostałych parametrów walidacyjnych testu oraz wartość AUC, która pomimo tego, że istotnie statystycznie różniła się od standardu, to była klasyfikowana jako doskonała, można uznać ten test za przydatny do wykrywania swoitych przeciwciał w PF. W przypadku testu służącego do wykrywania swoitych przeciwciał przeciwko Ery, interpretacja wyników w oparciu o optymalny dla PF punkt odcięcia, spowodowała zmiany poziomów poszczególnych parametrów walidacyjnych testu, tak, że większość z nich była akceptowalna, przy czym, podobnie jak w przypadku testu służącego do wykrywania swoitych przeciwciał przeciwko HEV, znaczącemu obniżeniu uległa swoistość, co rodzi ryzyko uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich. Wartość AUC istotnie różniła się od standardu, ale pozostawała doskonała. Jednakże z uwagi na nieznaczny wzrost współczynnika κ , wskazujący jedynie na umiarkowaną zgodność, użyteczność tego testu do wykrywania swoitych przeciwciał może być wątpliwa. Najmniej obiecujące wyniki zostały uzyskane w odniesieniu do ostatniego z omawianych testów. W przypadku testu służącego do wykrywania swoitych przeciwciał skierowanych przeciwko App, interpretacja wyników analiz PF w oparciu o OT spowodowała zmiany poziomów poszczególnych parametrów walidacyjnych testu. Jednakże spośród wszystkich analizowanych testów, w tym przypadku uzyskano najmniej satysfakcjonujące wartości czułości, swoistości i NPV. Dodatkowo, pomimo, że zastosowanie OT spowodowało wzrost współczynnika κ , to nie wpłynęło to na zmianą klasyfikacji zgodności i pozostała ona jedynie umiarkowana. Uzyskana wartość AUC dla PF była istotnie statystycznie niższa od standardu i pomimo, że była klasyfikowana jako znacząca, to była najniższa spośród wszystkich analizowanych testów. Biorąc powyższe pod uwagę, można zakładać ograniczoną przydatność tego testu do wykrywania swoitych przeciwciał w PF, nawet po zastosowaniu optymalnego dla PF punktu odcięcia.

Otrzymane wyniki wskazują, że PF uzyskany wyłącznie z jąder może służyć jako alternatywna próbka w badaniach nad występowaniem przeciwciał przeciwko wybranym patogenom u prosiąt, a wyniki mogą być odnoszone do całego miotu. Jednakże należy podkreślić, że przydatność PF do tego celu jest warunkowana w dużej mierze przez wybrany do przeprowadzenia analizy test ELISA i zastosowany punkt odcięcia. Dla przykładu, w przypadku testu służącego do wykrywania swoistych przeciwciał przeciwko PEDV, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy odsetkiem dodatnich próbek w surowicach prosiąt a PF, bez względu na zastosowany do interpretacji wyników PF punkt odcięcia. W przypadku testu służącego do wykrywania specyficznych przeciwciał anty-HEV, istotna statystycznie różnica w odsetku dodatnich próbek została zaobserwowana jedynie pomiędzy surowicą loszek a PF, kiedy wyniki analizy tej próbki były interpretowane w oparciu o punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu. W sytuacji, gdy wyniki analiz PF były interpretowane na podstawie optymalnego dla PF punktu odcięcia, odsetek dodatnich próbek w obrębie obu badanych materiałów był porównywalny. W przypadku testów służących do wykrywania swoistych przeciwciał anty-Mhp, anty-Ery i anty-IAV, istotne statystycznie różnice w odsetku dodatnich próbek były obserwowane pomiędzy surowicami prosiąt obu płci a PF, jeśli wyniki były interpretowane na podstawie punktów odcięcia rekomendowanych przez producentów testów. Gdy do interpretacji wyników PF zastosowano OT, odsetki surowic prosiąt obu płci oraz PF klasyfikowanych jako dodatnie były porównywalne. Powyższe wskazuje na przydatność PF uzyskiwanego wyłącznie z jąder do oceny występowania swoistych przeciwciał w obrębie grupy prosiąt zawierającej zarówno knurki jak i loszki, po zastosowaniu optymalnego dla PF punktu odcięcia. Warto podkreślić, że w przypadku testu służącego do wykrywania specyficznych przeciwciał anty-App, zastosowanie przy interpretacji wyników analiz PF optymalnego dla niego punktu odcięcia nie przyczyniło się do zniwelowania występujących istotnych statystycznie różnic pomiędzy odsetkiem próbek surowic prosiąt klasyfikowanych jako dodatnie a próbkami PF, wskazując na ograniczoną przydatność tego testu do omawianego celu.

Dostępna literatura w zakresie wyników prezentowanych w niniejszym rozdziale, ze względu na ich nowatorski charakter, jest mocno ograniczona. Jedną z opublikowanych prac wskazuje na przydatność PF do monitorowania występowania swoistych przeciwciał anty-Mhp za pomocą komercyjnego testu ELISA walidowanego dla krwi w stadach zarodowych (Magtoto i wsp., 2022). Test użyty w cytowanym badaniu charakteryzował

się znakomitą czułością (97,6%) i swoistością (100%) w odniesieniu do PF, nawet gdy wyniki analiz tego rodzaju próbki były interpretowane w oparciu o punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu, a zastosowanie punkt odcięcia optymalnego dla PF umożliwiło dodatkowe zoptymalizowanie tych wartości (Magtoto i wsp., 2022). Kolejna z dostępnych prac wskazuje na przydatność PF do wykrywania swoistych przeciwciał anty-PRRSV za pomocą komercyjnego testu ELISA (Lopez i wsp., 2022). Wykazano, że przyjęcie optymalnego dla PF punktu odcięcia pozwala na zoptymalizowanie czułości i swoistości testu w stosunku do tego typu materiału do odpowiednio 99,0% i 100% (Lopez i wsp., 2022). Należy jednak podkreślić, że w badaniach przywoływanych powyżej, dokonywano modyfikacji w procedurze analiz laboratoryjnych, poprzez zastosowanie mniejszych rozcieńczeń próbek PF, w porównaniu do tych, zalecanych dla surowicy (Lopez i wsp., 2022; Magtoto i wsp., 2022) oraz modyfikowanie stosowanego koniugatu, czy czasu inkubacji (Lopez i wsp., 2022), co niewątpliwie mogło wpływać na otrzymane wyniki. Zastosowanie tego typu zmian wymaga bez wątpienia większej wiedzy i doświadczenia i może być problematyczne w laboratoriach terenowych. W naszym eksperymencie, sprawdziliśmy przydatność PF do oceny występowania swoistych przeciwciał za pomocą dostępnych na rynku testów ELISA, bez żadnych modyfikacji w przeprowadzanej procedurze. Co więcej, w przywoływanych publikacjach, analizowane próbki PF były próbkami zbiorczymi (Lopez i wsp., 2022; Magtoto i wsp., 2022). W innej z prac, oceniono przydatność indywidulanych próbek PF do wykrywania swoistych przeciwciał anty-HEV za pomocą komercyjnego testu ELISA (Di Bartolo i wsp., 2020), podobnie jak w niniejszym eksperymencie, bez żadnych dodatkowych modyfikacji w obrębie procedury laboratoryjnej. Wyniki tej pracy są częściowo zbieżne z wynikami niniejszego eksperymentu i wskazują, że wyznaczenie i zastosowanie optymalnego dla PF punktu odcięcia może wpłynąć na zmianę parametrów walidacyjnych testu diagnostycznego. Gdy otrzymane przez Di Bartolo i wsp. (2020) wyniki były interpretowane w oparciu o punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu, uzyskano względnie dobrą swoistość (89%), przy niezadawalającej czułości (47%) i słabej zgodności (0,19). Zastosowanie optymalnego dla PF punktu odcięcia podwyższyło czułość (77%) testu oraz zgodność (0,27) przy jednoczesnym obniżeniu swoistości (56%) (Di Bartolo i wsp., 2020). Gorsze wartości parametrów walidacyjnych testów w odniesieniu do PF w doświadczeniach, w których dokonywano zmiany jedynie w odniesieniu do punktu odcięcia stosowanego do klasyfikacji wyników analiz, w porównaniu do doświadczeń,

w których dodatkowo dokonywano modyfikacji w obrębie rozcieńczeń próbki PF (Lopez i wsp., 2022; Magtoto i wsp., 2022) i/lub zmian metodycznych może potwierdzać teorię, że PF stanowi „rozcieńczoną” próbkę surowicy. Nie wykluczone też, że w przypadku wykorzystanych w naszym doświadczeniu testów, których parametry walidacyjne w odniesieniu do PF pozostawały niezadawalające po zastosowaniu optymalnego dla PF punktu odcięcia, mogłyby ulec poprawie po dalszych modyfikacjach w obrębie procedury laboratoryjnej jak np. zastosowanie w odniesieniu do PF niższych rozcieńczeń niż te rekomendowane dla próbek surowicy.

Większość naukowców oceniała przydatność PF do celów diagnostycznej jako próbki zbiorczej, natomiast w literaturze brakuje badań oceniających wpływ takiego postępowania (pulowania) na wiarygodność uzyskiwanych wyników. W niektórych sytuacjach, takich jak np. monitoring występowania patogenów w stadzie, badanie pulowanych próbek PF może być bardziej pożądane niż badanie indywidualnych próbek, głównie ze względu ekonomicznych. Trzeba pamiętać, że pulowanie próbek może jednak wpływać na wynik testu, co wykazano w obecnych badaniach. Należy zawsze mieć na uwadze potencjalne rozcieńczenia dodatnich próbek przez próbki ujemne w sytuacji ich pulowania, zwłaszcza w okresie rozwijającego się zakażenia lub w końcowym okresie zwalczania choroby (mało zwierząt dodatnich). Pomimo tego, że interpretacja otrzymanych wyników w oparciu o optymalny dla PF punkt odcięcia znacząco zwiększyła liczbę zbiorczych próbek prawidłowo sklasyfikowanych przez wykorzystane testy, to w większości przypadków pulowanie pojedynczych próbek dodatnich z próbkami ujemnymi nie pozwoliło na właściwe zaklasyfikowanie puli i wykrycie osobnika dodatniego. Maksymalne rozcieńczenie w jakim próbki zbiorcze były poprawnie klasyfikowane zależało także od stopnia pozytywności próbki wyjściowej. W przypadku wysoko-dodatnich próbek, 4 z 5 ocenianych testów ELISA, prawidłowo sklasyfikowały wszystkie próbki o rozcieńczeniach do 1:40 włącznie, a 2 z nich prawidłowo sklasyfikowały wszystkie próbki, niezależnie od poziomu rozcieńczenia, w sytuacji, gdy wyniki były interpretowane w oparciu o optymalny dla PF punkt odcięcia. W odniesieniu do umiarkowanie-dodatnich próbek, jedynie 2 testy ELISA prawidłowo sklasyfikowały wszystkie próbki o rozcieńczeniach do 1:40 włącznie, gdy wyniki były interpretowane w oparciu o optymalny dla PF punkt odcięcia. W przypadku nisko-dodatnich próbek, 3 spośród analizowanych testów ELISA niewłaściwie klasyfikowało próbki już w rozcieńczeniu 1:10. Jednakże, jeden z testów prawidłowo sklasyfikował

wszystkie próbki o rozcieńczeniach do 1:20 włącznie i dwie próbki o rozcieńczeniu 1:40, w przypadku interpretacji wyników zgodnie z optymalnym dla PF punktem odcięcia. Interpretacja wyników tych analiz w oparciu o punkt odcięcia rekomendowany przed producenta testu skutkowała nieprawidłową klasyfikacją większości nisko-dodatnich i umiarkowanie-dodatnich próbek, niezależnie od ich rozcieńczenia. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami Di Bartolo i wsp. (2020). W przywoływanym badaniu, dodatnie próbki PF zostały zaklasyfikowane do 1 z 4 grup, w zależności od stopnia pozytywności, a następnie rozcieńczone (1:4, 1:5, 1:6 i 1:7) i przebadane komercyjnym testem ELISA walidowanym dla surowicy. Przy interpretacji wyników zgodnie z punktem odcięcia wyznaczonym dla PF, wszystkie z analizowanych próbek zostały prawidłowo sklasyfikowane, natomiast gdy wyniki były interpretowane w oparciu o punkt odcięcia rekomendowany dla surowicy, to jedynie wysoko-dodatnie próbki były sklasyfikowane jako dodatnie (Di Bartolo i wsp., 2020). Pulowanie indywidualnych próbek PF i badanie ich jako próbki zbiorcze wpływa zatem na wiarygodność otrzymywanych wyników. Dlatego, zwłaszcza w badaniu rozpoznawczym lub końcowym etapie zwalczania choroby/eradykacji patogenów, pulowanie próbek PF nawet tylko w obrębie jednego miotu należy uznać za ryzykowne w aspekcie właściwej interpretacji sytuacji w stadzie. W przypadku analizy próbek zbiorczych PF za pomocą komercyjnych testów ELISA, wyznaczanie i interpretacja wyników w oparciu o optymalny dla PF punkt odcięcia zwiększa liczbę próbek poprawnie sklasyfikowanych. Jednakże, w przypadku niektórych testów, w celu uzyskania wiarygodnych wyników, konieczne mogą się okazać dodatkowe modyfikacje w obrębie procedury laboratoryjnej.

9. Podsumowanie

Według naszej wiedzy jest to pierwsze doniesienie, w którym potwierdzono obecność Ig, cytokin i APP w PF. Ze względu na brak istotnych różnic między stężeniem IgG, IgA, IL-1 β , IL-4, IL-6 i IFN- γ w surowicy prosiąt i PF, należy stwierdzić, że PF stanowi obiecującą alternatywę dla krwi do oceny tych parametrów u prosiąt ssących. Ponadto, ze względu na korelacje między stężeniami IgA, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ w surowicy loch i PF oraz stężeniami IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ i Pig-MAP w sianie i PF, PF może potencjalnie stanowić cenną i istotną matrycę do pośredniej oceny parametrów immunologicznych loch.

Uzyskane wyniki potwierdziły obecność w PF wszystkich badanych przeciwciał oraz wskazują, że niektóre dostępne na rynku testy ELISA, zaprojektowane do wykrywania swoistych przeciwciał w surowicy, mogą być również stosowane do ich oznaczania w PF, pod warunkiem zastosowania optymalnej wartości granicznej (cut-off). Należy jednak zaznaczyć, że wyniki są specyficzne dla poszczególnych, użytych w badaniach testów ELISA i nie mogą być ekstrapolowane na inne dostępne testy. W przypadku niektórych zestawów, parametry testu oraz miary zgodności, pozostawały niezadowalające, nawet po zastosowaniu optymalnej wartości granicznej dla PF. Takie testy mogą wymagać wprowadzenia większych modyfikacji procedury oznaczania przed ich użyciem do analiz PF. Dodatkowo, należy mieć na uwadze, że bezkrytyczne pulowanie próbek PF może prowadzić do błędnej interpretacji sytuacji epidemiologicznej w stadzie. Brak istotnych różnic między wynikami uzyskanymi z surowic samców i samic oraz między surowicami prosiąt obu płci a PF wskazuje na możliwość interpretacji wyników analiz PF dla całego miotu.

10. Wnioski

1. Płyn technologiczny uzyskiwany wyłącznie z jąder może stanowić próbkę alternatywną dla surowicy do oceny stężeń parametrów immunologicznych (IgG, IgA, IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ) u prosiąt, a wyniki mogą być interpretowane dla całego miotu. Dodatnia korelacja pomiędzy stężeniami IgA, IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ , w PF uzyskanym wyłącznie z jąder i surowicy loch oraz pomiędzy stężeniami IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ i Pig-MAP w PF i siarce wskazuje na potencjalną możliwość wykorzystania PF do pośredniej oceny tych parametrów u loch - matek badanych prosiąt.
2. Płyn technologiczny uzyskany wyłącznie z jąder może być użyteczną próbką do wykrywania swoistych przeciwciał przeciwko ważnym patogenom świń, a wyniki mogą być interpretowane dla całego miotu.
3. Komercyjne testy ELISA opracowane dla surowicy mogą być przydatne do badania próbek PF, w tym oceny stężeń parametrów immunologicznych oraz, po zastosowaniu przy interpretacji wyników optymalnego dla tej próbki punktu odcięcia, wykrywania swoistych przeciwciał.
4. Pulowanie indywidualnych próbek PF i badanie jako próbki zbiorcze może wpływać na wyniki analiz laboratoryjnych w kierunku występowania swoistych przeciwciał, niezależnie od przyjętego dla danego testu ELISA punktu odcięcia.

11. Bibliografia

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system, 6th ed. Elsevier Health Sciences; 2019.
2. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:701-21.
3. Arrêté du 17 novembre 2021 modifiant l'arrêté du 24 février 2020 modifiant l'arrêté du 16 janvier 2003 établissant les normes minimales relatives à la protection des porcs. On-line: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000044340570> (Dostęp: 12.06.2025).
4. Augustyniak A, Pomorska-Mól M. Vaccination Failures in Pigs - The Impact of Chosen Factors on the Immunisation Efficacy. *Vaccines (Basel)*. 2023;11:230.
5. Backus G, Higuera M, Juul N, Nalon E, De Briyne N. Second Progress Report 2015–2017 on the European Declaration on Alternatives to Surgical Castration of Pigs. Expert Group on ending surgical castration of pigs. Brussels, May 2018.
6. Bandrick M, Ariza-Nieto C, Baidoo SK, Molitor TW. Colostral antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. *Dev Comp Immunol*. 2014;43:114-20.
7. Bianchi AT, Scholten JW, Moonen Leusen BH, Boersma WJ. Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing. *Dev Comp Immunol*. 1999;23:511-20.
8. Björstöm-Kraft J, Christopher-Hennings J, Daly R, Main R, Torrison J, Thurn M, Zimmerman J. The use of oral fluid diagnostics in swine medicine. *J. Swine Health Prod*. 2018;26:262-9.
9. Bland IM, Rooke JA, Bland VC, Sinclair AG, Edwards SA. The acquisition of IgG from colostrum by piglets. *Proc. British Society of Animal Science. Cambridge University Press*. 1999; 189.
10. Boettcher J, Hensch A, Gangl A, Janowetz B, Alex M, Niemeyer H, Wittkowski G. Testicles of castrated piglets an anachronism-but a powerful sample for disease

- surveillance in sow herds. *Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21. 2010.*
11. Bourne FJ, Curtis J. The transfer of immunoglobins IgG, IgA and IgM from serum to colostrum and milk in the sow. *Immunology.* 1973;24:157-62.
 12. Cabrera RA, Lin X, Campbell JM, Moeser AJ, Odle J. Influence of birth order, birth weight, colostrum and serum immunoglobulin G on neonatal piglet survival. *J Anim Sci Biotechnol.* 2012;3:42.
 13. Campbell J, Jacobi S, Liu Y, Robertson KH, Drayton J, Medina I, Polo J, Crenshaw J, Odle J. Evaluation of immunoglobulin G absorption from colostrum supplements gavaged to newborn piglets. *J Anim Sci.* 2012;90 Suppl 4:299-301.
 14. Carella E, Caruso C, Moreno A, Di Blasio A, Oberto F, Vitale N, Masoero L. Meat Juice and Oral Fluid as Alternatives to Serum for Aujeszky Disease Monitoring in Pigs. *Microorganisms.* 2023;11:2418.
 15. Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* 2013;328:222-5.
 16. Çorbacıoğlu ŞK, Aksel G. Receiver operating characteristic curve analysis in diagnostic accuracy studies: A guide to interpreting the area under the curve value. *Turk J Emerg Med.* 2023;23:195-8.
 17. Coventry BJ, Ashdown ML, Quinn MA, Markovic SN, Yatomi-Clarke SL, Robinson AP. CRP identifies homeostatic immune oscillations in cancer patients: a potential treatment targeting tool? *J Transl Med.* 2009;7:102.
 18. Cukrowska B, Sinkora J, Reháková Z, Sinkora M, Splíchal I, Tucková L, Avrameas S, Saalmüller A, Barot-Ciorbaru R, Tlaskalová-Hogenová H. Isotype and antibody specificity of spontaneously formed immunoglobulins in pig fetuses and germ-free piglets: production by CD5- B cells. *Immunology.* 1996a;88:611-7.
 19. Cukrowska B, Sinkora J, Mandel L, Splíchal I, Bianchi AT, Kovárů F, Tlaskalová-Hogenová H. Thymic B cells of pig fetuses and germ-free pigs spontaneously produce IgM, IgG and IgA: detection by ELISPOT method. *Immunology.* 1996b;87:487-92.
 20. Curtis J, Bourne FJ. Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochim Biophys Acta.* 1971;23:319-32.
 21. De Andrea M, Ravera R, Gioia D, Gariglio M, Landolfo S. The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol.* 2002;6 Suppl A:A41-6; discussion A55-8.

22. De Briyne N, Berg C, Blaha T, Temple D. Pig castration: will the EU manage to ban pig castration by 2018? *Porcine Health Manag.* 2016;2:29.
23. Devillers N, Farmer C, Le Dividich J, Prunier A. Variability of colostrum yield and colostrum intake in pigs. *Animal.* 2007;1:1033-41.
24. Devillers N, Le Dividich J, Prunier A. Influence of colostrum intake on piglet survival and immunity. *Animal.* 2011;5:1605-12.
25. Di Bartolo I, De Sabato L, Chelli E, Alborali GL, Tonni M, Monini M, De Lucia A, Ostanello F. Pilot Investigation on the Presence of Anti-Hepatitis E Virus (HEV) Antibodies in Piglet Processing Fluids. *Animals (Basel).* 2020;10:1168.
26. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118:503-8.
27. Dyrektywa Rady 2008/120/WE z dnia 18 grudnia 2008 r. ustanawiająca minimalne normy ochrony świń. On-line: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/ALL/?uri=CELEX%3A32008L0120> (Dostęp: 12.06.2025).
28. Duarte DAS, Schroyen M, Mota RR, Vanderick S, Gengler N. Recent genetic advances on boar taint reduction as an alternative to castration: a review. *J Appl Genet.* 2021;62:137-50.
29. Europejska Deklaracja na rzecz alternatyw dla kastracji chirurgicznej. On-line: https://food.ec.europa.eu/animals/animal-welfare/eu-animal-welfare-legislation/animal-welfare-farm/pigs/alternatives-pig-castration_en (Dostęp: 12.06.2025).
30. Fablet C, Renson P, Pol F, Dorenlor V, Mahé S, Eono F, Eveno E, Le Dimna M, Liegard-Vanhecke D, Eudier S, Rose N, Bourry O. 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). *Vet Microbiol.* 2017;204:25-34.
31. Faizi N, Alvi Y. Biostatistics manual for Health Research: A practical guide to data analysis. Elsevier; 2023.
32. Fan M, Bian L, Tian X, Hu Z, Wu W, Sun L, Yuan G, Li S, Yue L, Wang Y, Wu L, Wang Y, Yan Z, Ren J, Li X. Infection characteristics of porcine circovirus type 2 in different herds from intensive farms in China, 2022. *Front Vet Sci.* 2023;10:1187753.
33. Federation of Veterinarians of Europe. Position paper on pig castration. 2019. On-line: <https://fve.org/publications/pig-castration/> (Dostęp: 12.06.2025).

34. Feinstein AR Clinical biostatistics XXXI. On the sensitivity, specificity, and discrimination of diagnostic tests. *Clin Pharmacol Ther.* 1975;17:104-16.
35. Fossum C. Cytokines as markers for infections and their effect on growth performance and well-being in the pig. *Domest Anim Endocrinol.* 1998;15:439-44.
36. Fossum C, Wattrang E, Fuxler L, Jensen KT, Wallgren P. Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine--a possible role for serum interleukin-6. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;64:161-72.
37. Frenyó VL, Pethes G, Antal T, Szabó I. Changes in colostral and serum IgG content in swine in relation to time. *Vet Res Commun.* 1981;4:275-82.
38. Gomes-Neves E, Teixeira MF, Cardoso MF. Occurrence of tail docking and tail biting in weaner pigs—A preliminary study in Portuguese abattoirs. *Livest. Sci.* 2024;287:105533.
39. Hashira S, Okitsu-Negishi S, Yoshino K. Interleukin 8 in the human colostrum. *Biol Neonate.* 2002;82:34-8.
40. Hennig-Pauka I, Menzel A, Boehme TR, Schierbaum H, Ganter M, Schulz J. Haptoglobin and C-Reactive Protein-Non-specific Markers for Nursery Conditions in Swine. *Front Vet Sci.* 2019;6:92.
41. Hernández-Caravaca I, Gourgues SF, Rodríguez V, Estrada ED, Cerón JJ, Escribano D. Serum acute phase response induced by different vaccination protocols against circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglets. *Res Vet Sci.* 2017;114:69-73.
42. Hiss-Pesch S, Daniel F, Dunkelberg-Denk S, Mielenz M, Sauerwein H. Transfer of maternal haptoglobin to suckling piglets. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;144:104-10.
43. Hulten C, Johansson E, Fossum C, Wallgren, P. Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 2003;95:75-89.
44. Inoue R, Tsukahara T. Composition and physiological functions of the porcine colostrum. *Anim Sci J.* 2021;92:e13618.
45. IFIP Institut du porc. Sytuacja w zakresie kastracji świń w Unii Europejskiej. 2022. On-line: https://www.3trzy3.pl/artyku%C5%82y/sytuacja-w-zakresie-kastracji-%C5%9Bwi%C5%84-w-unii-europejskiej_4897/ (Dostęp: 12.06.2025).

46. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3:118-27.
47. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.
48. Jensen PT, Pedersen KB. Studies on immunoglobulins and trypsin inhibitor in colostrum and milk from sows and in serum of their piglets. *Acta Vet. Scand.* 1979;20:60–72.
49. Kaiser M, Jacobson M, Andersen PH, Bækbo P, Cerón JJ, Dahl J, Escribano D, Jacobsen S. Inflammatory markers before and after farrowing in healthy sows and in sows affected with postpartum dysgalactia syndrome. *BMC Vet Res.* 2018;14:83. Erratum in: *BMC Vet Res.* 2018;14:175.
50. Kielland C, Rootwelt V, Reksen O, Framstad T. The association between immunoglobulin G in sow colostrum and piglet plasma. *J Anim Sci.* 2015;93:4453-62. Erratum in: *J Anim Sci.* 2015;93:5469.
51. Klobasa F, Werhahn E, Butler JE. Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. *Res Vet Sci.* 1981;31:195-206.
52. Klobasa F, Butler JE, Werhahn E, Habe F. Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multiparity on *de novo* immunoglobulin synthesis by piglets. *Vet. Immunol. Immu-nopathol.* 1986;11:149–59.
53. Klobasa F, Werhahn E, Butler JE. Composition of sow milk during lactation. *J Anim Sci.* 1987;64:1458-66.
54. Klobasa F, Butler JE, Habe F. Maternal-neonatal immunoregulation: suppression of *de novo* synthesis of IgG and IgA, but not IgM, in neonatal pigs by bovine colostrum, is lost upon storage. *Am J Vet Res.* 1990;51:1407-12.
55. Landis, J.R., Koch, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159-74.
56. Levast B, Berri M, Wilson HL, Meurens F, Salmon H. Development of gut immunoglobulin A production in piglet in response to innate and environmental factors. *Dev Comp Immunol.* 2014;44:235-44.
57. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci (Weinh).* 2021;8:e2004433.

58. Llamas Moya S, Boyle LA, Lynch PB, Arkins S. Age-related changes in pro-inflammatory cytokines, acute phase proteins and cortisol concentrations in neonatal piglets. *Neonatology*. 2007;91:44-8.
59. López W, Angulo J, Zimmerman J, Linhares D. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *J Swine Health Prod*. 2018;26:146-50.
60. López WA, Zimmerman JJ, Gauger PC, Harmon KM, Bradner L, Zhang M, Giménez-Lirola L, Ramirez A, Cano JP, Linhares DCL. Practical aspects of PRRSV RNA detection in processing fluids collected in commercial swine farms. *Prev Vet Med*. 2020;180:105021.
61. López W, Zimmerman J, Gauger P, Harmon K, Magtoto R, Bradner L, Holtkamp D, Zhang M, Zhang J, Ramirez A, Linhares D, Giménez-Lirola L. Considerations in the use of processing fluids for the detection of PRRSV RNA and antibody. *J Vet Diagn Invest*. 2022;34:859-63.
62. Maciag SS, Bellaver FV, Bombassaro G, Haach V, Morés MAZ, Baron LF, Coldebella A, Bastos AP. On the influence of the source of porcine colostrum in the development of early immune ontogeny in piglets. *Sci Rep*. 2022;12:15630.
63. Magtoto R, Armenta-Leyva B, Dizon-Magtoto P, Cheng T, Clavijo MJ, Johnson C, Lopez W, Baum D, Zimmerman J, Gimenez-Lirola LG. Performance of a *Mycoplasma hyopneumoniae* serum ELISA for antibody detection in processing fluids. *J Swine Health Prod*. 2022;30:165-70.
64. Markowska-Daniel I, Pomorska-Mól M. Shifts in immunoglobulins levels in the porcine mammary secretions during whole lactation period. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 2010;54:345–9.
65. Markowska-Daniel I, Pomorska-Mól M, Pejsak Z. Dynamic changes of immunoglobulin concentrations in pig colostrum and serum around parturition. *Pol J Vet Sci*. 2010;13:21-7.
66. Martin M, Tesouro MA, Gonz Am N, Pi A, Lampreave F. Major plasma proteins in pig serum during postnatal development. *Reprod Fertil Dev*. 2005;17:439-45.
67. Martínez-Boixaderas N, Garza-Moreno L, Sibila M, Segalés J. Impact of maternally derived immunity on immune responses elicited by piglet early vaccination against the most common pathogens involved in porcine respiratory disease complex. *Porcine Health Manag*. 2022;8:11.

68. Maxim, L.D., Niebo, R., Utell, M. J. Screening tests: a review with examples. *Inhal Toxicol.* 2019;31:298.
69. Molina RM, Chittick W, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Rowland RR, Zimmerman JJ. Diagnostic performance of assays for the detection of anti-Porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies in serum and muscle transudate ("meat juice") based on samples collected under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20:735-43.
70. Monaghan TF, Rahman SN, Agudelo CW, Wein AJ, Lazar JM, Everaert K, Dmochowski RR. Foundational Statistical Principles in Medical Research: Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value, and Negative Predictive Value. *Medicina (Kaunas).* 2021;57:503.
71. Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J.* 2004;168:28-40.
72. Nguyen TV, Yuan L, Azevedo MS, Jeon KI, Gonzalez AM, Saif LJ. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 117: 236–48.
73. Nielsen B, Ekeröth L, Bager F, Lind P. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. *J Vet Diagn Invest.* 1998;10:158-63.
74. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004;35:163-87.
75. Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I. Age-dependent changes in relative and absolute size of lymphocyte subsets in the blood of pigs from birth to slaughter. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2011;55:305-10.
76. Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I, Kwit K, Stępniewska K, Pejsak Z. Kinetics of the response of four positive acute phase proteins in pigs experimentally infected with toxigenic *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol.* 2011;152:429-35.
77. Pomorska-Mól M, Kwit K, Markowska-Daniel I. Major acute phase proteins in pig serum from birth to slaughter. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2012a;56:553-7.
78. Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I, Pejsak Z. Acute phase protein response during subclinical infection of pigs with H1N1 swine influenza virus. *Vet Microbiol.* 2012b;159:499-503

79. Pomorska-Mól M, Kwit K, Pejsak Z, Markowska-Daniel I. Analysis of the acute-phase protein response in pigs to clinical and subclinical infection with H3N2 swine influenza virus. *Influenza Other Respir Viruses*. 2014;8:228-34.
80. Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I, Kwit K, Czyżewska E, Dors A, Rachubik J, Pejsak Z. Immune and inflammatory response in pigs during acute influenza caused by H1N1 swine influenza virus. *Arch Virol*. 2014a;159:2605-14.
81. Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I, Kwit K, Stępniewska K, Pejsak Z. Profile of the porcine acute-phase proteins response following experimental co-infection with H3N2 swine influenza virus and *Pasteurella multocida*. *Biomarkers*. 2015;20:189-95.
82. Poonsuk K, Cheng TY, Ji J, Zimmerman J, Giménez-Lirola L. Detection of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) IgG and IgA in muscle tissue exudate ("meat juice") specimens. *Porcine Health Manag*. 2018;4:31.
83. Porter P. Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sow and their absorption by the neonatal piglet. *Biochim Biophys Acta*. 1969;181:381-92.
84. Quesnel H. Colostrum production by sows: variability of colostrum yield and immunoglobulin G concentrations. *Animal*. 2011;5:1546-53.
85. Rooke JA, Bland IM. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livest. Prod. Sci*. 2002;78:13–23.
86. Rooke JA, Carranca C, Bland IM, Sinclair AG, Ewen M, Bland VC, Edwards SA. Relationships between passive absorption of immunoglobulin G by the piglet and plasma concentrations of immunoglobulin G at weaning. *Livest. Prod. Sci*. 2003; 81:223–34.
87. Saco Y, Bassols A. Acute phase proteins in cattle and swine: A review. *Vet Clin Pathol*. 2023;52 Suppl 1:50-63.
88. Salmon H, Berri M, Gerdts V, Meurens F. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev Comp Immunol*. 2009;33:384-93.
89. Schnapper A, Uhr G, Meyer W. Growth kinetics of porcine lymphatic organs during early postnatal life. *Anat Histol Embryol*. 2003;32:297-304.
90. Šinkora J, Reháková Z, Sinkora M, Cukrowska B, Tlaskalová-Hogenová H, Bianchi AT, De Geus B. Expression of CD2 on porcine B lymphocytes. *Immunology*. 1998;95:443-9.

91. Šinkora M, Butler JE. The ontogeny of the porcine immune system. *Dev Comp Immunol.* 2009;33:273-83.
92. Šinkora M, Sinkora J, Reháková Z, Splíchal I, Yang H, Parkhouse RM, Trebichavsk I. Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. *Immunology.* 1998;95:595-603.
93. Solano-Aguilar GI, Vengroski KG, Beshah E, Lunney JK. Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine. *J Immunol Methods.* 2000;241:185-99.
94. Stepanova H, Samankova P, Leva L, Sinkora J, Faldyna M. Early postnatal development of the immune system in piglets: the redistribution of T lymphocyte subsets. *Cell Immunol.* 2007;249:73-9.
95. Szczubiał M, Urban-Chmiel R. Tumour necrosis factor- α and interleukin-6 concentration in the serum of sows with the MMA syndrome. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2008;52:267-70.
96. Tarasiuk G, Remmenga MD, O'Hara KC, Talbert MK, Mielke S, Rotolo ML, Zaabel P, Zhang D, Zimmerman JJ. Optimizing Swine Oral Fluid Sampling Procedures for Growing Pigs in Commercial Settings. *Pathogens.* 2024;13:1097.
97. Tierschutzgesetz. On-line: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>. (Dostęp 12.06.2025).
98. Trevisan G, Jablonski E, Angulo J, Lopez WA, Linhares DCL. Use of processing fluid samples for longitudinal monitoring of PRRS virus in herds undergoing virus elimination. *Porcine Health Manag.* 2019;5:18.
99. Turlewicz-Podbielska H, Włodarek J, Pomorska-Mól M. Noninvasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review. *J Vet Diagn Invest.* 2020;32:503-12.
100. Turlewicz-Podbielska H, Dors A, Pomorska-Mól M. Evaluation of the utility of testicular-only processing fluid for porcine reproductive and respiratory syndrome virus diagnostics and the effect of sample pooling on the test results. *J Vet Res.* 2025;69:7-16.
101. Verheyen AJ, Maes DG, Mateusen B, Deprez P, Janssens GP, de Lange L, Counotte G. Serum biochemical reference values for gestating and lactating sows. *Vet J.* 2007;174:92-8.
102. 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. *Vet Microbiol.* 2018;225:149-56.
103. Wacheck S, Werres C, Mohn U, Dorn S, Soutschek E, Fredriksson-Ahomaa M, Märklbauer E. Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9:655-60.
 104. Weiler U, Font-I-Furnols M, Tomasevič I, Bonneau M. Alternatives to Piglet Castration: From Issues to Solutions. *Animals (Basel).* 2021;11:1041.
 105. Werner C, Schubbert A, Schrödl W, Krüger M, Sundrum A. Effects of feeding different roughage components to sows in gestation on bacteriological and immunological parameters in colostrum and immune response of piglets. *Arch Anim Nutr.* 2014;68:29-41.
 106. Wierzchosławski K, Kwit K, Pejsak Z, Pomorska-Mól M. Selected serum acute-phase proteins in peripartum sows and evaluation of their diagnostic usefulness. *Anim Reprod Sci.* 2018;191:44-55.
 107. Zeman, D.H. The “best” diagnostic test. *J Swine Health Prod.* 1997;5, 159–60.
 108. Zhu Y, Osterlundh I, Hultén F, Magnusson U. Tumor necrosis factor- α , interleukin-6, serum amyloid A, haptoglobin, and cortisol concentrations in sows following intramammary inoculation of *Escherichia coli*. *Am J Vet Res.* 2004;65:1434-9.

12. Spis rycin i tabel

Ryc. 1. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń (mg/ml) IgG, IgA oraz IgM w badanym materiale.

Ryc. 2. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń (ng/ml) IFN- γ w badanym materiale.

Ryc. 3. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń (pg/ml) IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 i TNF- α w badanym materiale.

Ryc. 4. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń (mg/ml) Hp w badanym materiale.

Ryc. 5. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń Pig-MAP (μ g/ml) w badanym materiale.

Ryc. 6. Średnie ($\pm$ SD) wartości stężeń CRP (μ g/ml) w badanym materiale.

Ryc. 7. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko App, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Ryc. 8. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Ery, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Ryc. 9. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko HEV, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Ryc. 10. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko PEDV, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Ryc. 11. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko IAV, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Ryc. 12. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Mhp, uzyskanych dla surowicy (sS/Pref) i PF (PTS/P).

Tabela 1. Wybrane dane dotyczące komercyjnych testów ELISA wykorzystanych w eksperymencie.

Tabela 2. Wykaz testów wykorzystanych w badaniach wraz z liczbą próbek przebadanych w poszczególnych kierunkach.

Tabela 3. Zakresy kwalifikacji próbek dodatnich do grup o niskim, średnim i wysokim wyniku dodatnim w zależności od zastosowanego testu.

Tabela 4. Klasyfikacja dokładności testu w odniesieniu do PF w zależności od uzyskanej wartości AUC.

Tabela 5. Korelacje pomiędzy stężeniami IgG, IgA i IgM w analizowanych próbkach.

Tabela 6. Korelacje pomiędzy stężeniami IL- β , IL-4, IL-6, IL-8 i IFN- γ w analizowanych próbkach.

Tabela 7. Korelacje pomiędzy stężeniami Hp, Pig-MAP i CRP w analizowanych próbkach.

Tabela 8. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko App, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Tabela 9. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko App dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Tabela 10. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko App), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Tabela 11. Klasyfikacja szeregu rozcieńczeń nisko-, umiarkowanie- i wysoko-dodatnich próbek (zawierających przeciwciała przeciwko App) w zależności od przyjętego punktu odcięcia.

Tabela 12. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Ery, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Tabela 13. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Ery dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Tabela 14. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko Ery), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Tabela 15. Klasyfikacja szeregu rozcieńczeń nisko-, umiarkowanie- i wysoko-dodatnich próbek (zawierających przeciwciała przeciwko Ery) w zależności od przyjętego punktu odcięcia.

Tabela 16. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko HEV, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Tabela 17. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko HEV dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Tabela 18. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko HEV), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Tabela 19. Klasyfikacja szeregu rozcieńczeń nisko-, umiarkowanie- i wysoko-dodatnich próbek (zawierających przeciwciała przeciwko HEV) w zależności od przyjętego punktu odcięcia.

Tabela 20. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko PEDV, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Tabela 21. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko PEDV dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Tabela 22. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko PEDV), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Tabela 23. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko IAV, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Tabela 24. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko IAV dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Tabela 25. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko IAV), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Tabela 26. Klasyfikacja szeregu rozcieńczeń nisko-, umiarkowanie- i wysoko-dodatnich próbek (zawierających przeciwciała dla IAV) w zależności od przyjętego punktu odcięcia.

Tabela 27. Wskaźnik mocy diagnostycznej zastosowanej metody (AUC), dokładność (ACC) oraz wartość optymalnego punktu odcięcia (*ang. optimal threshold*, OT) dla testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Mhp, wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów.

Tabela 28. Porównanie parametrów walidacyjnych testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko Mhp dla PF, w zależności od przyjętych punktów odcięcia.

Tabela 29. Porównanie odsetka próbek zaklasyfikowanych jako dodatnie (zawierające przeciwciała przeciwko Mhp), w zależności od analizowanego materiału i przyjętego punktu odcięcia.

Tabela 30. Klasyfikacja szeregu rozcieńczeń nisko-, umiarkowanie- i wysoko-dodatnich próbek (zawierających przeciwciała przeciwko Mhp) w zależności od przyjętego punktu odcięcia

13. Oświadczenia współautorów publikacji

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

W związku z ubieganiem się lek. wet. Agaty Augustyniak o stopień doktora oświadczam, że jestem współautorem następujących publikacji:

1. Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Immune status of piglets during the first week of life: Current knowledge, significance and assessment – a review. *Annals of Animal Science*. 2023, 23, 391-403.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wyniósł 20% i polegał na przeglądzie dostępnej literatury w zakresie tematu publikacji, współredagowaniu draftu publikacji oraz recenzji i edycji tekstu publikacji.

2. Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Concentrations of selected immunological parameters in the serum and processing fluid of suckling piglets and the serum and colostrum of their mothers. *BMC Veterinary Research*. 2024, 20:170.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wyniósł 20% i polegał na udziale w zaprojektowaniu badań, koordynacji badań, poszukiwaniu źródeł finansowania badań oraz recenzji i edycji końcowej wersji tekstu publikacji.

3. Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Field study on the utility of fluid obtained from testicles as a sample for detecting antibodies to selected swine pathogens. *Scientific Reports*. 2025, 15: 22402.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wyniósł 20% i polegał na udziale w zaprojektowaniu badań, koordynacji badań, poszukiwaniu źródeł finansowania badań oraz recenzji i edycji końcowej wersji tekstu publikacji.


Prof. dr hab.
Małgorzata Pomorska-Mól
.....
Podpis

Dr n. wet. Ewelina Czyżewska-Dors
Katedra Chorób Wewnętrznych i Diagnostyki
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 02.07.2025 r.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

W związku z ubieganiem się lek. wet. Agaty Augustyniak o stopień doktora oświadczam, że jestem współautorem następujących publikacji:

1. Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Immune status of piglets during the first week of life: Current knowledge, significance and assessment – a review. *Annals of Animal Science*. 2023, 23, 391-403.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wyniósł 10% i polegał na przeglądzie dostępnej literatury w zakresie tematu publikacji, tworzeniu tekstu publikacji oraz recenzji i edycji tekstu publikacji.

2. Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Concentrations of selected immunological parameters in the serum and processing fluid of suckling piglets and the serum and colostrum of their mothers. *BMC Veterinary Research*. 2024, 20:170.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wyniósł 10% i polegał na przeglądzie dostępnej literatury w zakresie tematu publikacji, przyjmowaniu i archiwizacji próbek wykorzystywanych do badań, interpretacji danych oraz recenzji i edycji tekstu publikacji.

3. Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Field study on the utility of fluid obtained from testicles as a sample for detecting antibodies to selected swine pathogens. *Scientific Reports*. 2025, 15: 22402.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wyniósł 10% i polegał na przeglądzie dostępnej literatury w zakresie tematu publikacji, przyjmowaniu i archiwizacji próbek wykorzystywanych do badań, interpretacji danych oraz recenzji i edycji tekstu publikacji.



Podpis

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

W związku z moim ubieganiem się o przyznanie stopnia doktora oświadczam, że jestem współautorem następujących publikacji:

1. Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Immune status of piglets during the first week of life: Current knowledge, significance and assessment – a review. *Annals of Animal Science*. 2023, 23, 391-403.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wyniósł 70% i polegał na przeglądzie dostępnej literatury w zakresie tematu publikacji, tworzeniu tekstu publikacji oraz recenzji i edycji końcowej wersji tekstu publikacji.

2. Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Concentrations of selected immunological parameters in the serum and processing fluid of suckling piglets and the serum and colostrum of their mothers. *BMC Veterinary Research*. 2024, 20:170.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wyniósł 70% i polegał na udziale w zaprojektowaniu badań, przeglądzie literatury i gromadzeniu dostępnych danych w temacie badań, przyjmowaniu i archiwizacji próbek wykorzystywanych do badań, przeprowadzaniu analiz laboratoryjnych, interpretacji uzyskanych danych, tworzeniu tekstu publikacji oraz recenzji i edycji końcowej wersji tekstu publikacji.

3. Augustyniak A., Czyżewska-Dors E., Pomorska-Mól M. Field study on the utility of fluid obtained from testicles as a sample for detecting antibodies to selected swine pathogens. *Scientific Reports*. 2025, 15: 22402.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wyniósł 70% i polegał na udziale w zaprojektowaniu badań, przeglądzie literatury i gromadzeniu dostępnych danych w temacie badań, przyjmowaniu i archiwizacji próbek wykorzystywanych do badań, przeprowadzaniu analiz laboratoryjnych, interpretacji uzyskanych danych, tworzeniu tekstu publikacji oraz recenzji i edycji końcowej wersji tekstu publikacji.



Podpis

14. Artykuły wchodzące w skład cyklu



IMMUNE STATUS OF PIGLETS DURING THE FIRST WEEK OF LIFE: CURRENT KNOWLEDGE, SIGNIFICANCE AND ASSESSMENT – A REVIEW*

Agata Augustyniak¹, Ewelina Czyżewska-Dors², Małgorzata Pomorska-Mól^{1*}

¹Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Poznan University of Life Sciences, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland

²Department of Internal Diseases and Diagnostics, Poznan University of Life Sciences, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland

*Corresponding author: mpomorska@up.poznan.pl

Abstract

The immune system of neonate piglets differs from adult pigs in structure and competence. Although piglets are born immunocompetent, they are genuinely immunologically defenseless. To survive in the environment, piglets need passive protection provided by sow's colostrum and milk when constantly exposed to numerous pathogens. Early assessment of piglets' immune status may enable rapid intervention in case of detection of any deficiencies or disorders. Moreover, awareness of the piglets' immunocompetence and the level of maternally-derived antibodies (MDA) may allow the creation of a proper vaccine schedule. Hence, extending knowledge of prenatal ontogeny of the porcine immune system, the immune status of neonate piglets' and the immunological components of porcine colostrum is crucial. Since animal welfare has become a more critical element of animal production, new, non-invasive sampling methodologies are highly desirable for the evaluation of piglets' immune status.

Key words: neonate, piglets, immune status

The piglet's immune system begins to develop in the early stages of prenatal ontogeny, during the embryonic period of embryogenesis (Šinkora and Butler, 2009). However, neonate piglets' immune systems differ from those of adult pigs in both morphology and function. For example, the mesenteric lymph nodes and Peyer's patches are smaller in piglets and have fewer Ig-secreting cells than do those of adult pigs (Levast et al., 2014). Moreover, the jejunal lymph nodes of newborn piglets consist of a chain of single lymph nodes parallel to the small intestine on both sides of the mesentery; in contrast, in two-week-old piglets the jejunal lymph nodes merge into an almost confluent band of lymphatic tissue (Schnapper et al., 2003). The cellular components of the piglet's immune system are not fully operational by the end of gestation (Stepanova et al., 2007; Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2011). They have limited external antigen stimulation during the fetal period, which results in a minimal number of peripheral double-positive $\alpha\beta$ T cells (effector or memory T cells). Moreover, the lymphocyte B population consists of immature cells (Šinkora and Butler, 2009). In addition, an epitheliochorial structure of the porcine placenta effectively precludes the transfer of immunoglobulins or immune cells (Rooke and Bland, 2002). Colostrum and milk thus constitute the only sources of maternal immunity (Rooke and Bland,

2002). It has been confirmed that fetuses can produce their own antibodies against antigens in the final third of gestation (Martinez-Boixaderas et al., 2022); however, their ability to respond to antigen stimuli is feeble (Martinez-Boixaderas et al., 2022). Therefore, although piglets are born immunocompetent, they are immunologically vulnerable and rely on passive immunity early in life (Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2009). With the beginning of extrauterine life, piglets are exposed to various environmental antigens, unlike during prenatal life. The development of primary immunity is too slow to protect piglets from pathogens, and piglets' adaptive immunity is primitive compared to adults' (Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2010 a). The acquisition of appropriate amounts of high-quality colostrum is thus significant. Colostrum, defined as the first secretion of a mammary gland, usually released within 24 hours after farrowing, provides newborn piglets with energy and passive immunity (Inoue and Tsukahara, 2021). Its early ingestion by newborn piglets is crucial for their further healthy development and growth (Inoue and Tsukahara, 2021). The immune components of the colostrum include highly concentrated immunoglobulins and many other elements, such as cytokines, cellular components (e.g., lymphocytes, and phagocytes), and various growth factors (Inoue and Tsukahara, 2021). Piglets' immune

*This work was supported by the National Science Centre (DEC- 2020/37/B/NZ7/00021).

systems are of great interest to researchers, and gaining knowledge of this subject would allow for improvements in the immune status of piglets, as well their future healthy growth and performance; this all brings measurable effects to the pig production sector (Šinkora et al., 1998 a; Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2010 b). In addition, a piglet's immunological status shortly after birth is an important question for effective vaccination management. Knowledge of the immune status of piglets may also enable rapid intervention when a deficiency or disorder is detected. The ideal situation is when all litters, as well as all piglets in each litter within a herd, have a similar immune status. Such similarities are desirable both in immunocompetence as well as in the level of colostrum (maternal) antibodies against pathogens that are present in the herd.

In this paper, we review the early prenatal ontogeny of the swine immune system, the immunological components of porcine colostrum, and piglets' immunological status during the first week of life.

Prenatal ontogeny of swine immune system

Morphogenesis, hematopoiesis, and lymphopoiesis

Porcine gestation lasts about 114–116 days (Belt et al., 1971). By the end of porcine organogenesis, on day 35 of gestation, the lymphatic system has already been physiologically formed; nevertheless, when the bone marrow starts its hematopoietic activity, lymphoid components and lymphocytes are rare in the various organs (Šinkora and Butler, 2009). Due to the expansion of peripheral lymphatic organs between days 60 and 90 of gestation, the lymph nodes, including mesenteric lymph nodes, are negligible up to day 70 of gestation. Porcine lymphopoiesis is known as lymphoid hematopoiesis, as the B cells develop in the primary hematopoietic organs and the pro-T cell progenitors that settle the thymus are derived from the same hematopoietic centers; the lymphopoiesis of lymphocytes B and T is thus closely associated (Šinkora and Butler, 2009). The yolk sac is the first lymphopoietic organ. Hematopoiesis can be detected here as soon as the day 16 of gestation (Trebichavský et al., 1996; Šinkora et al., 2002). Nevertheless, its contribution to overall lymphocyte production is rather small, since the yolk sac involutes early, around day 24 or 27 of gestation. Subsequently, first the liver, and later (around day 45 of gestation) the bone marrow, are responsible for lymphopoietic activity and for the development of the preimmune B cell receptor repertoire (Šinkora and Butler, 2009).

Development of individual adaptive immunity components

Šinkora et al. (1998 a) investigated the surface phenotype of fetal lymphoid cells in the thymus, cord blood, spleen and mesenteric lymph nodes at different stages of gestation. This study indicates that the second trimester of gestation is the period when the major subpopulations of lymphocytes begin to appear (Table 1). The

first leucocytes with CD45 phenotype were observed in their research on day 35 of gestation in the fetal spleen and cord blood, and at day 40 of gestation in the mesenterium. However, there was an absence of cells with typical lymphocyte markers (CD3⁺). Among the lymphocyte population, B lymphocytes appeared at the earliest in the periphery. Their presence was detected at day 40 of gestation and they remained the predominant lymphocyte population in lymph nodes, spleen, and blood up to day 55 of gestation. The authors considered that these findings, in combination with those of the study of Cukrowska et al. (1996), indicate that sIgM⁺ B cells may be one of the first functional lymphocyte subpopulations in porcine fetuses (Šinkora et al., 1998 a). Cukrowska et al. (1996) observed the presence of immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin A (IgA), and immunoglobulin M (IgM) in fetus plasma and noted the ability of surface immunoglobulin M⁺ (sIgM⁺) CD5⁺ B cells isolated from the fetal liver to secrete IgM. Every fetal sIgM⁺ B lymphocyte was similar to an adult sIgM⁺ B cell on account of CD45RC and SLA-DR positivity. Furthermore, over 90% of sIgM⁺ cells were CD2⁺, and this marker was expressed as the B cells developing before sIgM, which is normally considered a B-cell precursor (Šinkora et al., 1998 a). The development of thymic tissues was observed as early as the day 21 of porcine gestation (Šinkora and Butler, 2009). The thymus is a specialized lymphatic organ in which T lymphocytes mature. Around day 40 of gestation, the first T cells can be detected in this organ (Šinkora and Butler, 2009). Subsequently, T cells have been observed on day 45 of gestation in the spleen and umbilical blood and, on day 50 in the mesenterium. In all cases, their appearance was delayed relative to that of the first sIgM⁺ lymphocytes (Šinkora et al., 1998 a). Among the T lymphocytes, $\gamma\delta$ T cells appeared first, developing primarily in the thymus; five days later they were also detectable in the periphery. The occurrence of $\gamma\delta$ T cells remains relatively constant up to day 90 of gestation; however, around farrowing, a sharp growth of $\gamma\delta$ T cells in the blood and spleen was noted (Šinkora et al., 1998 a). After that time, the blood and spleen selectively accumulated a great percentage of CD2⁺CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells and CD2⁺CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells, respectively (Šinkora et al., 1998 a). The count of T-cell receptor $\alpha\beta$ ⁺ (TCR $\alpha\beta$ ⁺) lymphocytes began to increase around day 55 of gestation, and soon after they outnumbered the T cells subset in the thymus and periphery (Šinkora et al., 1998 a). At about day 90 of gestation, the concentration of $\alpha\beta$ T cells plateaued (Šinkora et al., 1998 a). A growth in the number of B cells was also observed; hence sIgM⁺ and TCR $\alpha\beta$ T lymphocytes are prominent cells in the fetal periphery at this time (Šinkora et al., 1998 a). During late gestation, the relative proportion of $\alpha\beta$ T cells and B cells varies between individual organs. However, they are similar to those observed in neonate piglets (Šinkora et al., 1998 a). CD4⁺CD8⁺ $\alpha\beta$ T helper cells were the first prominent subset of $\alpha\beta$ T lymphocytes. Moreover, they also made up the greatest $\alpha\beta$ T cell subpopulation

within gestation (Šinkora et al., 1998 a). CD4⁺CD8^{hi}αβ cytotoxic T cells were absent up to day 55 of gestation; subsequently, their number increased until birth (Šinkora et al., 1998 a). In the study of Cukrowska et al. (1996), serum immunoglobulins of all isotypes were detected in fetuses at day 44 of gestation. The predominant immunoglobulin was IgM, and the overall immunoglobulin concentration was increased during ontogeny, independently of external stimuli. Moreover, antibody activity against autoantigens, phylogenetically conserved proteins, haptens, and bacterial components was found in the sera of fetuses at the end of embryonic life. Preimmune immunoglobulins can display a large spectrum of physiological functions, and many remain unknown. With other natural factors, they constitute the first line of defense during gestation and the early extrauterine stage of life (Cukrowska et al., 1996).

Development of individual innate immunity components

Data on the development and maturation of porcine innate immunity components is limited. Along with the beginning of hematopoietic activity of the primary lymphoid organs, cellular elements of the innate immunological system such as morphonuclear leukocytes, macrophages, and dendritic cells begin to appear (Table 1) (Šinkora and Butler, 2009). For example, macrophages were detected as soon as day 25 of gestation (Trebichavský et al., 1996). Cells with the natural killer (NK) phenotype also appeared early in the ontogeny, and CD3ε CD8^{lo} CD2⁺ lymphocytes were observed in the umbilical blood and spleen around day 45 of gestation (Šinkora et al., 1998 a). Their abundance varies from 1% to 10%, with an upward tendency over time

(Šinkora and Butler, 2009). Subsequently, NK cells were also detected in mesenteric lymph nodes (MLN) at about day 50 of gestation. However, their concentration was low (Šinkora et al., 1998 a). Later in the ontogeny, at approximately day 70 of gestation, the NK cell concentrations stabilize and then remain relatively constant until birth (Šinkora and Butler, 2009). Previous studies have shown that fetal NK cells lack the ability to kill before birth, and killing was delayed in germ-free piglets. This may suggest that colonization with microflora may be crucial to the complete functional development of these cells (Šinkora and Butler, 2009). Interferon-α secreting cells (IFN-α SC) were found in the fetal liver at a very early stage of fetal development, at day 26 of gestation, when differentiated lymphocytes were still not detectable (Splichal et al., 1994). After that, they were also detected in other tissues such as cord blood, spleen, and bone marrow. The authors suggested that IFN-α SC may represent an early antiviral defense mechanism (Splichal et al., 1994). An *in vitro* study performed on pig fetus macrophages and lymphocytes showed high cytoplasmic expression of tumor necrosis factor (TNF-α) when stimulated with bacterial mitogens (Trebichavský et al., 1995). The main producers of TNF-α at a later stage of development were macrophages. According to those authors, their findings may suggest that lymphocytes and macrophages play a pivotal role in the induction of inflammatory responses in fetuses (Trebichavský et al., 1995). Elevated interferon γ (IFN-γ) and TNF-α mRNA levels were observed in the tissues from porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and corresponded to elevated cytokine proteins in serum (Rowland, 2010).

Table 1. The first appearance of the particular immune components in porcine fetuses during prenatal ontogeny

Immune component	First appearance (day of gestation)	Location	References
Macrophages	25	No data	Trebichavský et al., 1996
CD45 ⁺ leukocytes	35	Spleen, cord blood	Šinkora et al., 1998 a
	40	Mesenterium	Šinkora et al., 1998 a
sIgM ⁺ cells	30	Liver	Šinkora et Butler, 2009
	40	Periphery	Šinkora et al., 1998 a
γδ T cells	40	Thymus	Šinkora and Butler, 2009
	45	Liver, cord blood, spleen	Šinkora and Butler, 2009
	60	Bone marrow	Šinkora and Butler, 2009
αβ T cells	55	Thymus	Šinkora nad Butler, 2009
	58	Liver, cord blood, spleen	Šinkora and Butler, 2009
	60	Mesenteric lymph nodes, bone marrow	Šinkora and Butler, 2009
NK cells	45	Spleen, umbilical cord	Šinkora et al., 1998 a
	~50	Mesenteric lymph nodes	Šinkora et al., 1998 a
Immunoglobulins	44	Blood	Cukrowska et al., 1996
Interferon α secreting cells	26	Liver	Splichal et al., 1994

Table 2. Characteristic of different classes immunoglobulins in sow's colostrum

Features	IgG	IgA	IgM	References
Origin	Almost 100% derives from sow's serum	60% produced locally in the mammary gland 40% derive from sow's serum	85% derives from sow's serum 15% produced locally in the mammary gland	Maciag et al., 2022; Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2009
Predominant immunoglobulin	Colostrum	Milk	–	Klobasa et al., 1987; Markowska-Daniel et al., 2010; Markowska-Daniel and Pomorska-Mól, 2010
Influence of sow's parity on colostrum concentration	Concentration significantly higher in multiparous sows than in gilts	No significant impact on the colostrum concentration Decreased concentration in the lacteal secretions of primiparous sows compared to multiparous sows	No significant effect on the colostrum concentration	Klobasa et al., 1986; Cabrera et al., 2012; Forner et al., 2021; Maciag et al., 2022
Highest concentration in sow's colostrum	At farrowing	At farrowing	At farrowing	Klobasa et al., 1987; Markowska-Daniel et al., 2010
The concentration of immunoglobulins in particular teats	Higher amounts in anterior teats	Higher amounts in anterior teats	No data	Ogawa et al., (2014 a)

Table 3. Changes in the concentration of immunoglobulins in the sow colostrum (mg/ml) within time according to different studies

Immunoglobulins concentration	Markowska-Daniel et al., 2010		Klobasa et al., 1987		Bland et al., 1999	
At farrowing	IgG	98.17	IgG	95.6	IgG	58.0
	IgA	23.20	IgA	21.2		
	IgM	9.07	IgM	9.1		
24 hours post parturition	IgG	19.74	IgG	14.2	IgG	8.7
	IgA	9.17	IgA	6.3		
	IgM	4.42	IgM	2.7		

The significance of colostrum

In Suidae species, as mentioned previously, the epitheliochorial nature of the placenta prevents the sows' immunoglobulins from being transferred. Colostrum is thus the sole source of passive immunity for piglets. Besides immunoglobulins, colostrum contains lymphocytes, cytokines, nucleotides, and essential growth factors that stimulate the postnatal development of the immune system and the visceral organs, as well as protein synthesis in skeletal muscles (Burrin et al., 1992).

Prior to the maturation of the piglets' own immunity, the maternally derived antibodies (MDA) confer protection against any infectious agents that the sows had been naturally infected with or vaccinated against (Klobasa et al., 1981; Inoue and Tsukahara, 2021). For example, a previous study indicated that maternally derived rotavirus-specific IgG significantly alleviates the clinical symptoms following experimental rotaviral infection of neonatal piglets (Ward et al., 1996). Another study conducted under field conditions documented that antibodies passively acquired by neonates through the colostrum and milk of sows vaccinated against the *Clostridium per-*

fringens toxoid substantially reduced piglet losses caused by *C. perfringens* type C (Springer and Selbitz, 1999).

Immunoglobulins

The most important element of the sows' colostrum from an immunological point of view are immunoglobulins. These constitute the most abundant component of whey protein (approximately 80%) (Inoue and Tsukahara, 2021). Because piglets are born with almost no serum antibodies, MDAs play a crucial role in protecting them against infectious agents before they develop their own adaptive immunity (Markowska-Daniel et al., 2010; Forner et al., 2021). However, MDAs can only protect piglets from infections caused by pathogens that the sow's immune system has faced.

To provide a sufficient level of passive immunity and to significantly reduce the risk of early death, the piglet needs to ingest a minimum of 200 mg of colostrum within the first 24 hours after birth; consumption of 250 mg per piglet should provide good future health (Quesnel et al., 2012). Antibodies can pass to the colostrum from sow serum or can be produced directly in the mammary

gland (Table 2) (Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2009). Almost 100% of colostrum IgG derives from sow's serum; meanwhile, more than 50% of IgA is produced locally in the mammary gland (Maciag et al., 2022). A substantial majority (around 85%) of colostrum IgM derives from sow's serum (Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2009). The predominant colostrum immunoglobulin is IgG (Klobasa et al., 1987; Markowska-Daniel et al., 2010; Markowska-Daniel and Pomorska-Mól, 2010). This is followed by IgA (the predominant immunoglobulin of milk) and IgM (Klobasa et al., 1987; Markowska-Daniel et al., 2010; Markowska-Daniel and Pomorska-Mól, 2010). Immunoglobulin concentration in colostrum is not constant, declining during the first 24 hours after farrowing; however, the decrease in the level of IgG is more drastic than in IgA or IgM (Table 3) (Klobasa et al., 1987; Markowska-Daniel et al., 2010). For example, in the research of Markowska-Daniel et al. (2010), the highest level of immunoglobulin was noted in the first colostrum, which is acquired at farrowing. The mean initial concentration was 118.5 mg/ml, 23.8 mg/ml, and 12.1 mg/ml for IgG, IgA, and IgM, respectively. After 24 hours, the concentration of IgA and IgM had reduced to 4.59 mg/ml and 4.29 mg/ml, respectively, and the level of IgG decreased to 34% of its initial level (Markowska-Daniel et al., 2010). This is partially consistent with the findings of Klobasa et al. (1987), where the mean IgG concentration was also highest at farrowing, at 95.6 mg/ml; IgA was at 21.2 mg/ml and IgM was at 9.1 mg/ml. These were subsequently reduced to 14.2 mg/ml, .3 mg/ml, and 2.7 mg/ml, respectively, 24 hours after birth (Klobasa et al., 1987). Bland et al. (1999) assessed the mean IgG concentration at farrowing as 58.0 mg/ml; 24 hours later, the level had decreased to 8.7 mg/ml (Bland et al., 1999). These studies also indicated that the concentration of colostrum immunoglobulins varies between sows. Kielland et al. (2015) noted that the concentration of colostrum IgG varies not only between particular sows, but also between herds (Kielland et al., 2015). Several studies have indicated that the concentration of IgG in the colostrum was significantly higher in multiparous sows than in gilts (Cabrera et al., 2012; Forner et al., 2021; Maciag et al., 2022). However, there was no such relationship for IgA content (Forner et al., 2021). This is consistent with Maciag et al. (2022), where the parity order did not significantly affect the colostrum concentration of IgA and IgM (Maciag et al., 2022). On the contrary, Klobasa et al. (1986) showed that the levels of IgA in the lacteal secretions of primiparous sows were lower than in multiparous sows (Klobasa et al., 1986). The level of immunoglobulins in colostrum can also vary between individual teats (Table 2). According to Ogawa et al. (2014 a), a higher amount of colostrum was obtained from anterior teats. Furthermore, a positive correlation between colostrum secretion volume (CSV) and IgG was observed from 6 hours after farrowing and from 12 hours after farrowing between CSV and both IgG and IgA. This may suggest that the anterior teats contain greater

amounts of IgA and IgG than the posterior teats (Ogawa et al., 2014 a). Other factors that can affect the final concentration of IgG in colostrum are the mother's genotype, age, and vaccination, as well as endocrine status, feeding, and herd management (Kielland et al., 2015; Maciag et al., 2022). The immunoglobulins ingested by piglets are taken up by nonspecific pinocytosis into the enterocytes (Rooke and Bland, 2002; Kielland et al., 2015). An important role in the absorption of immunoglobulin from the guts is played by trypsin inhibitor, which inhibits the enzymatic activity of trypsin and prevents denaturation of the immunoglobulins; however, its level in colostrum decreases within time (Jensen and Pedersen, 1979). The concentration of IgG in the piglet's serum depends on several factors, such as the amount of available and ingested colostrum, IgG absorption in the piglet's intestine, and gut closure, which occurs 24 to 36 hours after birth (Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2009; Kielland et al., 2015). The study of Kielland et al. (2015) indicates a strong association between the concentration of colostrum IgG and piglet serum IgG (Kielland et al., 2015). Interestingly, this is not consistent with some other studies, where a lack of correlation is demonstrated between levels of colostrum Ig and piglet's serum Ig (Markowska-Daniel et al., 2010). The concentration of piglet IgG decreased with each piglet born. However, this was not significantly associated with litter size, but was more dependent on the time of birth relative to farrowing onset (Kielland et al., 2015). Litter size affected colostrum intake but not the concentration of piglet IgG. This may be due to the flattening of piglets' plasma IgG concentration above a certain level of colostrum IgG (Kielland et al., 2015). Bland et al. (1999) have shown that, despite differences in colostrum intake (and hence IgG) between piglets, the total concentration of IgG in the piglet's plasma did not vary between litters. This may indicate that piglets can regulate the quantity of plasma IgG independently of the quantity of IgG obtained (Bland et al., 1999). In Kielland et al. (2015), a significant association was observed between body mass index (BMI) and piglets' IgG level on day 1. The authors further concluded that piglets with BMIs of 17 kg/m² or lower may not be strong enough to obtain sufficient amounts of IgG. (Kielland et al., 2015). Bandrick et al. (2014) demonstrated that levels of IgG and IgA in the serum of piglets that ingested colostrum mimicked the distribution of these immunoglobulins in the sow's colostrum. Furthermore, IgG and IgA were absent from piglet serum before colostrum intake. This may indicate nonselective absorption of colostrum immunoglobulins (Bandrick et al., 2014). A positive correlation between IgG levels in the serum of piglets at 7 days and 56 days of age may point to a positive relationship between initial antibody concentration in the piglet's serum and the development of their active immunity (Markowska-Daniel et al., 2010). According to Rooke et al. (2003), naturally suckling piglets start to produce IgG at 7 days of age. Its quantity was positively correlated with the amount of absorbed colostrum

IgG (Rooke et al., 2003). Curtis and Bourne (1973) indicate that active IgM production by piglets emerges from 10–12 days of age. Porter and Hill (1970) reported that IgM in suckling piglets begins to increase from 7 days of age. Active synthesis of IgA by suckling piglets up to 12 days of age does not contribute significantly to serum IgA concentrations (Curtis and Bourne, 1973). This suggests that piglets begin to effectively produce their own IgA at a later age, but to date, there is no conclusive data on this issue. Other investigation, with piglets weaned at different times (7, 14, 21 or 28 days) showed that endogenous colostrum/milk factors may be critical to promote IgA synthesis (Levast et al., 2010). Ultra-early weaned piglets (at 7 and 14 days) showed lower serum IgA concentrations at 21 days proving a deficiency in the IgA gut immune response development.

Cytokines

The presence has been noted in porcine colostrum of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon γ (IFN- γ), interleukin 1 α (IL-1 α), interleukin 1 receptor antagonist (IL-1RA), interleukin 2 (IL-2), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), interleukin 12 (IL-12), interleukin 18 (IL-18), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and transforming growth factor β (TGF- β) (Table 4) (Nguyen et al., 2007; Ogawa et al., 2014 b; Maciag et al., 2022). Maternal cytokines contained in the colostrum may play an instructive role in the maturation of the neonatal immune system (Nguyen et al., 2007). It is assumed that colostrum is the only source of various cytokines for newborn piglets (Nguyen et al., 2007). The study of Nguyen et al. (2007) indicated that the moderate correlation between sow blood and colostrum for IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, and IFN- γ indicates that these cytokines pass to the mammary gland from the sow's bloodstream. Given the lack of such a correlation between TNF- α and TGF- β 1 (the concentration of both in the colostrum being higher than in the sow's blood), they must be produced directly in the mammary gland (Nguyen et al., 2007). These cytokines were only present in the blood of piglets that ingested colostrum (Nguyen et al., 2007). The presence of IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-4, and IL-10 was not detected in the group of age-matched colostrum-deprived gnotobiotic piglets. The authors thus assumed that these cytokines do not pass through the placenta. However, IL-12 and TGF- β 1 were detected in the plasma of colostrum-deprived gnotobiotic piglets. This may indicate that piglets can produce the cytokines by themselves. In the mentioned study, the authors did not detect TNF- α in the plasma of piglets in either group. The lack of this cytokine in the serum of sows and piglets is probably due to some control mechanism that prevents prolonged inflammatory responses, which could further damage tissue (Nguyen et al., 2007). However, data concerning this cytokine is inconsistent: its presence in piglet plasma was observed in Maciag et al. (2022). Nguyen et al. (2007) found the highest concentration of the cytokines

in the secretion of the mammary gland on the first and second days after parturition; this correlated with the time of their peak concentrations in the piglet's serum. The predominant cytokine in the sow's colostrum was IL-4, followed by TGF- β 1. Other cytokines occurred at lower levels, and the least concentrated were IL-12, IL-10, and TNF- α (Nguyen et al., 2007). One *in vitro* study evaluated the impact of various concentrations of TGF- β 1 and IL-4 on porcine neonatal B cell responses (Nguyen et al., 2007). High TGF- β 1 levels caused suppressed immunoglobulin-secreting cell responses to LPS and rotavirus, and low TGF- β 1 levels led to isotype switching to IgA antibodies. IL-4 provoked inverse dose-dependent isotype switching to IgA. Moreover, it also improved IgM-secreting cell responses to LPS and rotavirus. Furthermore, an elevated concentration of Th2 cytokines or TGF- β in newborn piglets may be crucial for their acquisition of normal commensal microflora in the intestine, given the reduction of immune and inflammatory response in the gut (Nguyen et al., 2007). Maciag et al. (2022) found that concentrations of GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, and TNF- α were significantly higher in serum and colostrum of multiparous sows than in gilts (Maciag et al., 2022). Moreover, these above cytokines occurred at higher levels in the serum of piglets that received colostrum from multiparous sows than in the serum of piglets fed with gilt's colostrum. The lowest concentration of these cytokines was observed in the piglets fed with milk replacer. A greater tendency to innate inflammatory and anti-inflammatory responses, and a greater propensity to specific Th1 and Th2 responses, during the perinatal period was significantly correlated with piglets that suckled sow colostrum (Maciag et al., 2022). Ogawa et al. (2014 b) confirmed the presence of IL-18 in the colostrum, but not in the sow's milk. This cytokine is believed to regulate the immune system of newborn piglets (Ogawa et al., 2014 b). Elahi et al. (2017), using a pertussis model showed that immunization of pregnant sows with heat-inactivated bacteria may lead to the induction of various cytokines, such as TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, and IL-12/IL-23p40. Moreover, these cytokines were detectable next to pertussis-specific antibodies, not only in vaccinated sow serum and colostrum, but also in their progeny's serum and bronchoalveolar lavage fluid. Interestingly, active vaccination of newborn piglets with heat-inactivated bacteria led to high levels of IgG and IgA specifically, but no cytokines. Even though the concentration of antibodies in vaccinated piglets and of passively obtained antibodies were similar, the authors did not observe any protection against *Bordetella pertussis* infection in the vaccinated individuals. Elahi et al. (2017) hence conclude that the presence of passively transferred cytokines or antibodies affects newborn piglets' ability to secrete cytokines, and that this may suggest that the vaccinating the sow can affect the newborn's cytokine milieu and impact immune cell differentiation (Elahi et al., 2017).

Table 4. Characteristic of cytokines present in sow's colostrum and piglets' serum

Features	Cytokines	References
Presence in sow's colostrum	GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α , TGF- β	Nguyen et al., 2007; Ogawa et al., 2014 b; Maciag et al., 2022
Originating from sow's serum	IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ	Nguyen et al., 2007
Production directly in the mammary gland	TNF- α , TGF- β 1	Nguyen et al., 2007
Predominant cytokine of sow's colostrum	IL-4	Nguyen et al., 2007
Least concentrated in sow's colostrum	IL-12, IL-10, TNF- α	Nguyen et al., 2007
Concentration higher in multiparous sow than gilts	GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α	Maciag et al., 2022
Likely production by neonate piglets	IL-12, TGF- β 1	Nguyen et al., 2007

Cellular components

Porcine colostrum, apart from multiple proteins, also contains several types of cells (Wagstrom et al., 2000). It has been estimated that piglets ingest some 500–700 million colostrum cells daily (Nguyen et al., 2007), including epithelial cells, lymphocytes (T and B cells), and phagocytes (neutrophils and macrophages) (Wagstrom et al., 2000). In contrast to many mammal species, epithelial cells constitute a great fraction of sow mammary gland secretions, representing approximately 20%–40% of all the colostrum cells (Le Jan, 1996). Epithelial cells in the colostrum are small in size and have little or no IgA (Le Jan, 1996). They furthermore exhibit low expression levels of secretory components (Le Jan, 1996). Small epithelial cells can be propagated *in vitro* for at least three passages. When cultured in the presence of the serum of lactating sows, these cells differentiate and begin to produce α -lactoglobulin (Le Jan, 1996). Depending on their differentiation level, they display the ability to express major histocompatibility complex II (MHC II antigen) (Wagstrom et al., 2000). Moreover, it is considered that porcine colostrum epithelial cells can produce cytokines and can function as antigen-presenting cells (Wagstrom et al., 2000). Macrophages constitute about 7%–11% of cells (Maciag et al., 2022). 10%–25% of all porcine colostrum cells are lymphocytes, of which 70%–80% are T cells (Hlavova et al., 2014). According to Hlavova et al., (2014) the predominant cell types in colostrum are CD8⁺ single-positive T cells (53.6%), followed by CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells (21.1%), CD2⁺CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells (15.0%), and NK cells (13.5%). The CD4⁺ single-positive T cells (4.4%) and other $\gamma\delta$ T cell subpopulations were less common. The proportion of individual lymphocytes varies between colostrum and sow peripheral blood: the proportion of cytotoxic and double-positive T cells was significantly higher in colostrum than in peripheral blood (Hlavova et al., 2014). On the contrary, the proportion of helper T cells was higher in peripheral blood (Hlavova et al., 2014). The greatest number of T cells are found in the colostrum obtained around parturition, with their number significantly decreasing after the first eight hours of lactation. Afterwards, the number of T cells remains constant (Hlavova et al., 2014). Forner et al. (2021) assessed

the differences in the distribution of colostrum's humoral and cellular composition over 40 gilts and 40 sows (parity orders 3–4). Their results show that parity does not influence the total count of macrophages, granulocytes, or T and B cells. Nevertheless, multiparous sow colostrum contained significantly larger T lymphocyte subsets than gilts (i.e., central and effector memory CD4⁺ T cells or central memory CD8⁺ T cells). The authors concluded that parity order may influence the cell population and piglet immune adaptive response, which induces neutralizing antibodies and cellular immune responses (Forner et al., 2021). Williams (1993) demonstrated that the lymphocytes contained in colostrum could cross the intestinal wall and migrate via the piglet's bloodstream to various organs (including the liver, lungs, lymph nodes, and spleen). Moreover, Nechvatalova et al. (2011) demonstrated that these cells possess functional abilities (they can become activated) and display an antigen-specific activity in organs (Nechvatalova et al., 2011). Goubier et al. (2009) detected antigen-specific lymphocytes that were able to produce IFN γ and TNF α after *in vitro* stimulation with circoviral antigens vaccinated against PCV2 sow colostrum (Goubier et al., 2009). Bandrick et al. (2008) demonstrated that lymphocytes obtained by piglets from vaccinated sow colostrum can proliferate and participate in functional response to *Mycoplasma hyopneumoniae* (Bandrick et al., 2008). Hlavova et al. (2014) assessed the activation status of T and NK cells in colostrum using the expression of CCR7, CD11b, CD25, CD45RA, and MHC class II receptors. They managed to observe the expression of markers consistent with an effector memory phenotype on T cells; this might suggest that these were antigen-experienced cells. Based on the phenotype of colostrum-derived T lymphocytes and NK cells, those authors concluded that these components may play a role in mucosal immunity, and potentially in the transfer of passive immunity (Hlavova et al., 2014). A study by Bandrick et al. (2014) demonstrated that colostrum lymphocytes are selectively transferred into the suckling bloodstream. These can then influence neonatal piglets' innate and adaptive immune responses (Bandrick et al., 2014). B lymphocytes constitute about 20% of all lymphocytes in mammary secretions (Pomorska-Mól et al., 2010), and

the concentration of SWC7+ CD5+ cells turned out to be significantly higher in multiparous sow colostrum than in gilts (Forner et al., 2021). Maciag et al. (2022) indicated that levels of activated B and T cells were higher in piglets fed multiparous sow colostrum. Lymphocytes can cross the intestinal wall of newborn piglets only when they are viable and have derived from the dam of a particular piglet (Bandrick et al., 2011). This is not the case with immunoglobulins, which can be absorbed across the intestinal mucosa of neonatal piglets, regardless of the maternal source or donor species (Bandrick et al., 2011). As a result, fostered piglets that suckled colostrum from another sow than their natural dam will have deficiencies in maternal cell-mediated immunity (CMI) (Bandrick et al., 2011). Bandrick et al. (2011) had demonstrated that transfer of *Mycoplasma hyopneumoniae*-specific CMI to piglets occurs only when piglets were maintained with their biological dams for at least twelve hours after parturition (Bandrick et al., 2011). To conclude, maternal antigen-specific leukocytes, delivered to piglets via colostrum, may constitute an extra line of active defense against infection for neonatal piglets (Goubier et al., 2009).

Immunity of neonatal piglet

Mucosal immunity

After birth, neonatal piglets are exposed to plenty of various antigens. Most of them enter a host via mucosal membranes (Solano-Aguilar et al., 2001). Thus, these structures are equipped with specialised protective elements called mucosa-associated lymphoid tissue (MALT), distinct from remaining lymphatic tissue (Solano-Aguilar et al., 2001). Based on its distribution in the organism, several types of MALT were distinguished, i.e. gut-associated lymphoid tissue (GALT), nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) or bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) (Mazzoni et al., 2011). Due to the risk related to numerous potential pathogens or food-borne antigens and the presence of commensal microbiota, GALT is well developed and consists of the following structures: the Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and intraepithelial lymphocytes and lamina propria lymphocytes (Solano-Aguilar et al., 2001; Mazzoni et al., 2011). GALT of neonatal piglets is a relatively developed structure with pre-existing Peyer's patches (Levast et al., 2014). However, shortly after birth, the piglet's gut is characterized by a small number of lymphocytes T and antigen-presenting cells (Levast et al., 2014). Given exposure to numerous external antigens and commensal microorganisms, GALT enlarges in size and lymphocyte subset content and reaches maturity in conventionally-raised piglets within two months (Levast et al., 2014). At that time, the GALT of conventionally-raised piglets can respond to intestinal antigens with good T and B lymphocyte activation and IgA production (Levast et al., 2014). However, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches are still smaller and have fewer Ig-secreting cells than adult ones (Levast et al., 2014).

Solano-Aguilar et al. (2001) have described changes in lymphocyte subsets in mucosal tissues with increasing age. According to this study, the GALT of piglets varies from the GALT of adult pigs in the presence or count of the respective lymphocyte subsets. The authors also pointed out that the majority of the phenotypes characterized by increasing trends during the pre-weaning time were located on lymphocytes isolated from mesenteric lymph nodes and ileal Peyer's patches, which can further imply that these lymphocytes are key populations in the early postnatal period during the development of lymphoid cells (Solano-Aguilar et al., 2001). Rothkötter et al. (1991) studied lamina propria (LP) of normal and germ-free piglets in early postnatal period. According to this study, the number of LP lymphocytes has increased two-fold between the first and 29th day after farrowing. Moreover, the authors observed that the distribution of lymphocyte subsets exhibited an unusual pattern. Approximately 80% of T cells of piglets aged 1 to 5 days belonged to CD2⁺CD4⁺CD8⁺ subset. However, around 12 days post-parturition, this subset started to disappear. Interestingly, 49 days old germ-free piglets displayed similar T cell subset patterns as above mentioned conventionally raised piglets between 1 and 5 days. Ig-positive cells were observed later than T cells. On the first-day post-parturition, a minimal number of IgM⁺ was noted. Forty days later, the number of IgA⁺ was higher than IgM⁺. The authors conclude that the results obtained in the germ-free piglets may prove that the major changes in the LP are caused by the appearance of microbial antigens in the intestine (Rothkötter et al., 1991). Schnapper et al. (2003) have observed rapid changes occurring in piglet's lymphoid tissue – the weight of Peyer's patches, tonsil of the soft palate, lymph nodes (cranial mesenteric lymph center and bronchial lymph center), spleen and thymus have grown faster than the body weight of piglets and had been significantly enlarged during the first two weeks of life (Schnapper et al., 2003). The mammalian intestine is colonized with normal gut flora during the first few days of life (Butler et al., 2000). This component is believed to have an important role in providing health to its host, by among others inhibiting intestine colonization with pathogenic bacteria (Butler et al., 2000). Colostrum and milk constitute one of the sources that deliver gut microbes to newborn piglets (Mardiaga et al., 2018). Mardiaga et al. (2018) investigated gastrointestinal microflora and mucosal immune gene expression in newborn piglets that were reared in a cross-fostering model. Results of the above study show that although cross-fostering does not affect bacterial communities present in the neonate's intestine, the mRNA expression of TLR and inflammatory cytokines change within the location in the gastrointestinal tract. The authors suggested that the results presented in their study may indicate the influence of colostrum and maternal microbial communities on microflora development as well as mucosal immune gene expression in newborn piglets (Mardiaga et al., 2018). The secondary function of the mucosal system is to discriminate be-

tween pathogen-associated and non-pathogenic antigens. This phenomenon is called mucosal tolerance (Bailey et al., 2005). According to Bailey et al. (2005), data concerning response to intestine microflora are still inconsistent. One of the mechanisms involved in maintaining tolerance may be anergy or deletion of specific T-cells clones. It is grounded on the recognition of antigen on wrong presenting cells by antigen-naïve T cells. It is worth emphasizing here the role of dendritic cells, which are responsible for the presentation of antigens to naïve T cells. These cells exhibit the ability to switch naïve T cells to active response or tolerance. Thus, the interaction between these two types of cells is believed to determine the reaction. However, there are reports showing that the outcome of antigen recognition is determined by antigen-non-specific signals arrived directly at mucosal regulatory T cells (Bailey et al., 2005). As mentioned earlier, the mucosal system of neonates is immature after birth in comparison to adult ones. This agent may be responsible for the lack of active immune responses as well as the development of tolerance (Bailey et al., 2005).

Innate immunity

The components of porcine innate immunity are similar to those in many other mammals (Šinkora and Butler, 2009). Innate immunity is based on two main mechanisms: activation of cellular components, such as macrophages, neutrophils, NK cells, or dendritic cells; and the release of various extracellular mediators – such as cytokines, chemokines, and complement or antimicrobial peptides (Šinkora and Butler, 2009). The total number of leukocytes increases during the first week of neonate life (Talker et al., 2013). Pomorska-Mól et al. (2011) indicate that, on the first day of a piglet's life, the number of granulocytes is similar to the number of lymphocytes (Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2011). However, the absolute granulocyte size and lymphocyte number predominance decreases during the next three weeks. In addition, a positive correlation between the mean number and mean percentage of granulocytes and the piglet's age was observed (Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2011). They also showed that piglet granulocytes have decreased phagocytosis and weaker adhesive molecule expression than adults (Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2010 a). The median value of NK-cell numbers in piglets' blood is lowest at birth and increases from there (Talker et al., 2013). Talker et al. (2013) indicate that the presence of perforin was noted in all NK cells as early as the day of birth. This finding may imply that piglets' NK cells exhibit immediate cytotoxic activity (Talker et al., 2013). Nevertheless, it contrasts with previous research, where NK cells were isolated from pigs for up to two weeks after birth, and showed weak cytolytic activity against K562 target cells (Yang and Schultz, 1986). Moreover, Talker et al. (2013) observed that pigs possess CD3⁺CD8 α ⁺NKp46⁺ cells with entirely functional characteristics of NK cells; this is interesting because NKp46 was believed to be a species-spanning marker for NK

cells. However, no evident changes in phenotype or quantity caused by environmental changes or piglet ageing were observed for NK cells (Talker et al., 2013). Llamas Moya et al. (2007) investigated age-related changes in proinflammatory cytokines, acute phase proteins (APP), and cortisol concentrations during the first week of a piglet's life (Llamas Moya et al., 2007). According to this study, the concentration of TNF- α and haptoglobin (Hp) increased with age, while the serum amyloid A (SAA) level decreased. The lowest level of plasma TNF- α was observed on the first day after birth. On day 5, the concentration of TNF- α achieved its peak, and remained elevated on day 7. Similarly, the level of Hp was lowest on day 1, and after that increased with age. On the other hand, the concentration of plasma SAA was elevated on days 1, 3, and 5, but had significantly reduced by day 7. There were no age-dependent changes in the plasma concentration of IL-1 β or C-reactive protein (CRP). Interestingly, husbandry practices such as ear notching, teeth clipping, and tail docking did not affect other measured parameters, other than Hp. The authors thus suggested that such management practices did not result in systemic inflammation in the early postnatal life of piglets (Llamas Moya et al., 2007). Similarly, Martin et al. (2005) found that the Hp concentration in neonatal piglets' plasma was also low on day 1 after birth and subsequently increased (Martin et al., 2005). Moreover, an age-dependent increase in the level of plasma major acute-phase protein (Pig-MAP) from birth up to 4 days of age was observed. After that, the concentration of Pig-MAP remained relatively high. The authors suggested that the rapid increase in the levels of proteins that were low at birth suggests some variety of acute-phase response, and that this response may be an evolutionary adaptation of the piglets to managing during the first critical period of extrauterine life (Martin et al., 2005).

Adaptive immunity

The development of the cellular components of the pig immune system is not fully complete by the end of gestation (Stepanova et al., 2007; Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2011). The T cells, B cells, and peripheral blood mononuclear cells (PMBC) of neonatal piglets have a less developed ability to respond to mitogens and a lower number of antigen-presenting cells (Maciag et al., 2022). The total number of lymphocytes increases during the first week of a piglet's life (Talker et al., 2013). Some studies have indicated that CD4⁺ lymphocytes form the predominant subpopulation of T cells in neonate piglets at farrowing, while CD8⁺ lymphocytes are less common (Stepanova et al., 2007). On the other hand, in Pomorska-Mól and Markowska-Daniel (2011), the number of CD8⁺ cells was greater than the number of CD4⁺ cells. The ratio of CD4⁺ to CD8⁺ cells decreased with age as the CD8⁺ increased, which was accompanied by a proportional decrease in CD4⁺ lymphocyte numbers (Stepanova et al., 2007; Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2011). Double-positive CD4⁺CD8⁺ are less fre-

quent in neonate piglets than in adults, and their population increases with age, probably as a result of the antigen-dependent maturation of naive CD4⁺ T helper lymphocytes into antigen-specific memory T helper lymphocytes (Saalmüller et al., 2002; Stepanova et al., 2007). However, there is some variance, depending on the levels of double-positive CD4⁺CD8⁺ lymphocytes in piglets. According to Stepanova et al. (2007), these cells were rare during the first month of piglets' life, at 0.5%, while Pomorska-Mól and Markowska-Daniel (2011) indicated that the proportion of this subset on the first day of piglets' life was 6.63%. This discrepancy might result from the animals' conditions (experimental conditions versus commercial breeding farm) (Stepanova et al., 2007; Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2011). Stepanova et al. (2007) have noted changes in the subpopulations of T lymphocytes in the peripheral blood and secondary lymphoid tissue during the first month of the piglet's life. A significant age-dependent increase in the total concentration of $\gamma\delta$ T cells was noted in the blood and spleen, but not in the lymph nodes. However, there was significant growth in the percentage of the $\gamma\delta$ TCR+CD8⁺ subpopulation (Stepanova et al., 2007). Strong growth in the total number of $\gamma\delta$ T cells since birth was also confirmed in Talker et al. (2013), who observed significant phenotypic changes only within the CD2⁺ subset. Nevertheless, the increase in overall amounts was proportional to the increase of the CD2-T-cell subset (Talker et al., 2013). Due to the involvement of $\gamma\delta$ lymphocytes in innate immune efficiency, they are also considered to constitute part of the innate immunity (Šinkora and Butler, 2009). The pool of B lymphocytes in neonatal piglets is immature (Šinkora and Butler, 2009). The more significant percentage of peripheral sIgM⁺ B cells consists of sIgM⁺CD2⁺ B cells, and sIgM⁺CD2⁻ are relatively rare (Šinkora et al., 1998 b). This is interesting, as porcine B cells were considered not to express CD2 (Šinkora et al., 1998 a). According to Šinkora et al. (1998 b), after the piglet's gut has been colonized with a complex intestinal microflora, this proportion changes, and the number of CD2⁺ B cells increases with age, reaching 15%–35% of sIgM⁺ peripheral blood lymphocytes in week-old piglets. They suggested that the expression of CD2 may be related to the functional status of porcine B cells, but can then be lost as a consequence of the maturation process (Šinkora et al., 1998 b). Thus, the microflora-dependent sIgM⁺CD2⁻ lymphocytes in pigs can be activated/memory B cells (Šinkora et al., 1998 b). Antigen stimulation due to colonization of the intestinal duct, as well as contact with the extrauterine environment, results in the activation of T and B cells (Pomorska-Mól and Markowska-Daniel, 2010 a). Šinkora and Butler (2009) indicate that, in germ-free piglets, the development of the immune system is slower than in an age-matched control group, and these piglets were also unable to perform a humoral response (Šinkora and Butler, 2009). The maturation of the elements of adaptive immunity thus arises from several factors, such as whether maternal immunoglobu-

lins are obtained with the colostrum and whether there is any interaction with environmental microorganisms. These are essential for the appearance of primed T and B cells that subsequently develop into their effector and memory progeny (Šinkora and Butler, 2009). Primed T lymphocytes with elevated expression levels of CD25 meanwhile become effector/memory cells with elevated expression of MHC II and display a CD4⁺CD8 α ⁺ and CD2⁺CD8 α ⁺ $\gamma\delta$ T phenotype (Šinkora and Butler, 2009).

Assessment of piglets' immune status: current possibilities and perspectives

Although piglets are born immunocompetent – i.e. able to respond – they are at the same time immunologically defenseless. To survive in an environment where they are exposed to pathogens, they need their mother's protection, which is provided as passive immunity that comes with the colostrum and milk, in the form of antibodies and other regulatory elements involved in the immune response. Early assessment of a piglet's immune status may enable rapid intervention in case of deficiencies or disorders. In addition, knowledge of a piglet's immunocompetence and MDA levels is crucial to designing a proper vaccination schedule (Martínez-Boixaderas et al., 2022). Piglet protection can be achieved either passively, through the transfer of maternally derived immunity, or actively through vaccination. However, vaccinating piglets in the presence of remaining MDA might interfere with vaccine efficacy. Most works in the literature have dealt with the acquisition of passive humoral immunity by newborns, although the transmission of specific cellular immunity has also been reported (Le Jan, 1996; Nguyen et al., 2007; Pravieux et al., 2007). For example, it has been shown that colostrum-derived T cells could cross the intestinal barrier and enter the systemic circulation and lymphoid organs (Tuboly et al., 1995). These lymphocytes are also a potential source of cytokines and chemokines that may exert a regulatory effect on antigen-presenting cells and specific antigen responses. Mammary gland secretions thus also have immunoregulatory properties. Besides, colostrum contains numerous other components involved in the systemic immune processes, such as cytokines, interferons, lysozyme, lactoferrin, peroxidase, complement components, hormones, and other compounds involved in the mechanisms of innate immunity (Salmon, 1999; Schultz, 2006). These substances participate in the maturation of both local and systemic defense processes, as well as in the induction and orientation of the piglets' active response to the antigen (Salmon, 1999; Schultz, 2006). After being absorbed in the first 24 to 36 hours of life, antibodies and other colostrum components are transferred into the blood, where they provide systemic resistance to infectious agents in piglets (Inoue and Tsukahara, 2021). It is known that Ig plasma concentrations in piglets shortly after birth positively correlate with their chance of surviving the critical perinatal period (Devillers et al., 2011). Cytokines passed to piglets by their mother with

colostrum can play the role of “teacher” in the maturation of suckling piglets’ immune system (Nguyen et al., 2007). However, cytokine transmission with colostrum or milk is not well documented.

Studies on the immunological status of piglets are presently performed using blood samples. Blood collection from individual animals has been the method most commonly used in veterinary practice to obtain samples for monitoring and surveying herd health status, including for pigs. However, the technique is time-consuming, laborious, and stressful for both animals and collecting staff. In addition, sampling piglet blood is relatively difficult and carries a high mortality risk. For this reason, farmers and veterinarians often refrain from carrying out such tests, or postpone monitoring until later in production. This can significantly delay the detection of important health problems in the herd, including the identification of lactation problems in sows, irregularities in the vaccination of dams, or transmission of maternal immunity to piglets. A specimen that could be collected noninvasively and without inducing stress in the animal, while still offering accurate diagnostic information, would greatly benefit herd health status and disease monitoring. In the EU, noninvasive sampling methodologies for monitoring the health status of farm animals must comply with the EU’s general objectives on food safety policy (Regulation 652/2014), in which animal welfare and wellbeing are major issues. In the assessment of the immunological status of piglets, only one component of the immune response is usually considered – namely, humoral immunity, including its level and duration. It seems that a more detailed analysis of immunological parameters in this period (taking into account specific antibodies, and also the types of particular groups of immunoglobulins, cytokines, APP, and so on) would shed more light on the significance of maternal immunity and its level in piglets in the first days of life for their further development. The duration of maternal MDA refers to the age of the piglet at which their MDA levels fall below the limit of detection of the test used for evaluation (Opriessnig et al., 2004), or the rate of decay (“half-life”) of MDA (the time required for a 50% decrease in MDA levels) (Fort et al., 2009). The amount of antibodies and other immune factors transferred from sows to offspring is determined by the sow’s immunity level near parturition, the timing of colostrum intake, and the volume of colostrum ingested (Klobasa et al., 1981). Strengthening sow herd immunity through vaccination is an important management tool for preventing clinical signs in piglets and for delaying infection until the piglet immune system is fully developed (Poonsuk and Zimmerman, 2018). Noninvasive sample collection methods are thus desirable and of great research interest. The usefulness of oral fluid (OF) specimens for detecting antibody and pathogen genetic material in pig population is already accepted and commercially used (Prickett et al., 2008; Prickett and Zimmerman, 2010; Ramirez et al., 2012; Kittawornrat et al., 2014; Sattler et al., 2015).

Several advantages of the use of such noninvasive sampling have been reported: it allows efficient and low-cost collection of large numbers of diagnostic samples, and it permits repeated sampling without the risk of discomfort or stress (Turlewicz-Podbielska et al., 2020). Recently, processing fluid (PF) has become more widely used in diagnostic practice (Trevisan et al., 2019; López et al., 2022). PF consists of blood and tissue fluids obtained during castration and tail-docking, which are usually performed during the first week of a piglet’s life (3–5 days) (Turlewicz-Podbielska et al., 2020). As castration is still performed on many farms, gaining PF does not require additional procedures or animal restraint, and thus does not generate additional stressful situations. PF is considered a promising, practical, and inexpensive specimen that may improve the monitoring of some porcine diseases, such as PRRS (Turlewicz-Podbielska et al., 2020). The idea of using this type of specimen to monitor other swine diseases, as well as immune parameters such as cytokines, immunoglobulins, and APP shows some promise. An additional advantage of PF is that the specimen comes from piglets less than one week old. Studies indicate that collecting PF from such young piglets is very difficult, if not impossible (Jabłoński et al., 2011). Replacing traditional samples, such as blood or serum, with PF has numerous benefits, saving time, work, and costs while minimizing the stress associated with sampling, which positively impacts animal welfare and immunity. However, there is a lack of experimental data on its use for assessing the immunological status of piglets, including the correlation between the concentration of various immunological parameters in PF and the corresponding sera, which until now have been the material used in this type of determination (the gold standard).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References

- Bailey M., Haverson K., Inman C., Harris C., Jones P., Corfield G., Miller B., Stokes C. (2005). The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. *Proc. Nutr. Soc.*, 64: 451–457.
- Bandrick M., Pieters M., Pijoan C., Molitor T.W. (2008). Passive transfer of maternal *Mycoplasma hyopneumoniae*-specific cellular immunity to piglets. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15: 540–543.
- Bandrick M., Pieters M., Pijoan C., Baidoo S.K., Molitor T.W. (2011). Effect of cross-fostering on transfer of maternal immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* to piglets. *Vet. Record*, 168: 100–100.
- Bandrick M., Ariza-Niet C., Baidoo S.K., Molitor T.W. (2014). Colostrum antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. *Dev. Comp. Immunol.*, 43: 114–120.
- Belt W.D., Anderson L.L., Cavazos L.F., Melampy R.M. (1971). Cytoplasmic granules and relaxin levels in porcine corpora lutea. *Endocrinology*, 89: 1–10.
- Bland I.M., Rooke J.A., Bland V.C., Sinclair A.G., Edwards S.A. (1999). The acquisition of IgG from colostrum by piglets. *Proc.*

- British Society of Animal Science. Cambridge University Press, pp. 189–189.
- Burrin D.G., Shulman R.J., Reeds P.J., Davis T.A., Gravitt K.R. (1992). Porcine colostrum and milk stimulate visceral organ and skeletal muscle protein synthesis in neonatal piglets. *J. Nutr.*, 122: 1205–1213.
- Butler J.E., Sun J., Weber P., Navarro P., Francis D. (2000). Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets. III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the pre-immune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology*, 100: 119–130.
- Cabrera R.A., Lin X., Campbell J.M., Moeser A.J., Odle J. (2012). Influence of birth order, birth weight, colostrum and serum immunoglobulin G on neonatal piglet survival. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 3: 42.
- Cukrowska B., Sinkora J., Reháková Z., Sinkora M., Splichal I., Tucková L., Avrameas S., Saalmüller A., Barot-Ciorbaru R., Tlaskalová-Hogenová H. (1996). Isotype and antibody specificity of spontaneously formed immunoglobulins in pig fetuses and germ-free piglets: production by CD5- B cells. *Immunology*, 88: 611–617.
- Curtis J., Bourne F.J. (1973). Half-lives of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the serum of new-born pigs. *Immunology*, 24: 147–155.
- Devillers N., Le Dividich J., Prunier A. (2011). Influence of colostrum intake on piglet survival and immunity. *Animal*, 5: 1605–1612.
- Elahi S., Thompson D.R., Van Kessel J., Babiuk L.A., Gerdts V. (2017). Protective role of passively transferred maternal cytokines against *Bordetella pertussis* infection in newborn piglets. *Infect. Immun.*, 85: e01063-16.
- Forner R., Bombassaro G., Bellaver F.V., Maciag S., Fonseca F.N., Gava D., Lopes L., Marques M.G., Bastos A.P. (2021). Distribution difference of colostrum-derived B and T cells subsets in gilts and sows. *PLoS One*, 16: e0249366.
- Fort M., Sibila M., Pérez-Martin E., Nofrarias M., Mateu E., Segalés J. (2009). One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine*, 27: 4031–4037.
- Goubier A., Piras F., Gnudi M., Chapat L., El Garch H., Joisel F., Charreyre C., Richard S., Forest L., Andreoni C., Juillard V. (2009). Colostrum from sows vaccinated with an inactivated PCV2 vaccine contains antigen-specific leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1: 265.
- Hlavova K., Stepanova H., Faldyna M. (2014). The phenotype and activation status of T and NK cells in porcine colostrum suggest these are central/effector memory cells. *Vet. J.*, 202: 477–482.
- Inoue R., Tsukahara T. (2021). Composition and physiological functions of the porcine colostrum. *Anim. Sci. J.*, 92: e13618.
- Jabłoński A., Strawa M., Stadejek T. (2011). Impact of selected parameters on efficacy of pen based oral fluid collection from pigs. *Proc. 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, 59.
- Jensen P.T., Pedersen K.B. (1979). Studies on immunoglobulins and trypsin inhibitor in colostrum and milk from sows and in serum of their piglets. *Acta Vet. Scand.*, 20: 60–72.
- Kielland C., Rootwelt V., Reksen O., Framstad T. (2015). The association between immunoglobulin G in sow colostrum and piglet plasma. *J. Anim. Sci.*, 93: 4453–4462.
- Kittawornrat A., Panyasing Y., Goodell C., Wang C., Gauger P., Harmon K., Rauh R., Desfresne L., Levis I., Zimmerman J. (2014). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) surveillance using pre-weaning oral fluid samples detects circulation of wild-type PRRSV. *Vet. Microbiol.*, 168: 331–339.
- Klobasa F., Werhahn E., Butler J.E. (1981). Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. *Res. Vet. Sci.*, 31: 195–206.
- Klobasa F., Butler J.E., Werhahn E., Habe F. (1986). Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multiparity on de novo immunoglobulin synthesis by piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 11: 149–159.
- Klobasa F., Werhahn E., Butler J.E. (1987). Composition of sow milk during lactation. *J. Anim. Sci.*, 64: 1458–1466.
- Le Jan C. (1996). Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review. *Vet. Res.*, 27: 403–417.
- Levast B., de Monte M., Chevalayre C., Melo S., Berri M., Mangin F., Zanella G., Lantier I., Salmon H., Meurens F. (2010). Ultra-early weaning in piglets results in low serum IgA concentration and IL17 mRNA expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 137: 261–268.
- Levast B., Berri M., Wilson H.L., Meurens F., Salmon H. (2014). Development of gut immunoglobulin A production in piglet in response to innate and environmental factors. *Dev. Comp. Immunol.*, 44: 235–244.
- Llamas Moya S., Boyle L.A., Lynch P.B., Arkins S. (2007). Age-related changes in pro-inflammatory cytokines, acute phase proteins and cortisol concentrations in neonatal piglets. *Neonatology*, 91: 44–48.
- López W., Zimmerman J., Gauger P., Harmon K., Magtoto R., Bradner L., Holtkamp D., Zhang M., Zhang J., Ramirez A., Linhares D., Giménez-Lirola L. (2022). Considerations in the use of processing fluids for the detection of PRRSV RNA and antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 34: 859–863.
- Maciag S.S., Bellaver F.V., Bombassaro G., Haach V., Morés M.A.Z., Baron L.F., Coldebella A., Bastos A.P. (2022). The influence of source of porcine colostrum in development of early immune ontogeny in the piglet. (preprint; <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1486260/v1>)
- Maradiaga N., Aldridge B., Zeineldin M., Lowe J. (2018). Gastrointestinal microbiota and mucosal immune gene expression in neonatal pigs reared in a cross-fostering model. *Microb. Pathog.*, 121: 27–39.
- Markowska-Daniel I., Pomorska-Mól M. (2010). Shifts in immunoglobulins levels in the porcine mammary secretions during whole lactation period. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 54: 345–349.
- Markowska-Daniel I., Pomorska-Mól M., Pejsak Z. (2010). Dynamic changes of immunoglobulin concentrations in pig colostrum and serum around parturition. *Pol. J. Vet. Sci.*, 13: 21–27.
- Martin M., Tesouro M.A., González-Ramón N., Piñeiro A., Lampreave F. (2005). Major plasma proteins in pig serum during post-natal development. *Reprod. Fert. Develop.*, 17: 439–445.
- Martínez-Boixaderas N., Garza-Moreno L., Sibila M., Segalés J. (2022). Impact of maternally derived immunity on immune responses elicited by piglet early vaccination against the most common pathogens involved in porcine respiratory disease complex. *Porcine Health Manag.*, 8: 1–12.
- Mazzoni M., Bosi P., De Sordi N., Lalatta-Costerbosa G. (2011). Distribution, organization and innervation of gastric MALT in conventional piglet. *J. Anat.*, 219: 611–621.
- Nechvatalova K., Kudlackova H., Leva L., Babickova K., Faldyna M. (2011). Transfer of humoral and cell-mediated immunity via colostrum in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 142: 95–100.
- Nguyen T.V., Yuan L., Azevedo M.S., Jeon K.I., Gonzalez A.M., Saif L.J. (2007). Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 117: 236–248.
- Ogawa S., Tsukahara T., Tsuruta T., Nishibayashi R., Okutani M., Nakatani M., Higashide K., Iida S., Nakanishi N., Ushida K., Inoue R. (2014 a). Evaluation of secretion volume and immunoglobulin A and G concentrations in sow colostrum from anterior to posterior teats. *Anim. Sci. J.*, 85: 678–682.
- Ogawa S., Tsukahara T., Nishibayashi R., Nakatani M., Okutani M., Nakanishi N., Ushida K., Inoue R. (2014 b). Shotgun proteomic analysis of porcine colostrum and mature milk. *Anim. Sci. J.*, 85: 440–448.
- Opriessnig T., Yu S., Thacker E.L., Halbur P.G. (2004). Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *J. Swine Health Prod.*, 12: 186–191.
- Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I. (2009). Siara jako źródło odporności humoralnej oraz komórkowej dla prosiąt osesków (in Polish). *Med. Weter.*, 65: 237–240.
- Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I. (2010 a). Immunological status of piglets during the first weeks of life (in Polish). *Med. Weter.*, 66: 593–596.

- Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I. (2010 b). Prenatal ontogeny of lymphocytes in pigs (in Polish). *Med. Weter.*, 1: 17–21.
- Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I. (2011). Age-dependent changes in relative and absolute size of lymphocyte subsets in the blood of pigs from birth to slaughter. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 55: 305–310.
- Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I., Bednarek D. (2010). Flow cytometric analysis of leukocytes in porcine mammary secretions. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 54: 188–192.
- Poonsuk K., Zimmerman J. (2018). Historical and contemporary aspects of maternal immunity in swine. *Anim. Health Res. Rev.*, 19: 31–45.
- Porter P., Hill I.R. (1970). Serological changes in immunoglobulins IgG, IgA and IgM and *Escherichia coli* antibodies in the young pig. *Immunology*, 18: 565–573.
- Pravieux J.J., Poulet H., Charreyre C., Juillard V. (2007). Protection of newborn animals through maternal immunization. *J. Comp. Pathol.*, 137: 32–34.
- Prickett J.R., Zimmerman J.J. (2010). The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim. Health Res. Rev.*, 11: 207–216.
- Prickett J.R., Kim W., Simer R., Yoon K.J., Zimmerman J. (2008). Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J. Swine Health Prod.*, 16: 86–91.
- Ramirez A., Wang C., Prickett J.R., Pograničnyy 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. *Prev. Vet. Med.*, 104: 292–300.
- Rooke J.A., Bland I.M. (2002). The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livest. Prod. Sci.*, 78: 13–23.
- Rooke J.A., Carranca C., Bland I.M., Sinclair A.G., Ewen M., Bland V.C., Edwards S.A. (2003). Relationships between passive absorption of immunoglobulin G by the piglet and plasma concentrations of immunoglobulin G at weaning. *Livest. Prod. Sci.*, 81: 223–234.
- Rothkötter H.J., Ulbrich H., Pabst R. (1991). The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatr. Res.*, 29: 237–242.
- Rowland R.R. (2010). The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus. *Virus Res.*, 154: 114–122.
- Quesnel H., Farmer C., Devillers N. (2012). Colostrum intake: Influence on piglet performance and factors of variation. *Livest. Sci.*, 146: 105–114.
- Saalmüller A., Werner T., Fachinger V. (2002). T-helper cells from naive to committed. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 87: 137–45.
- Salmon H. (1999). The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 72: 143–155.
- Sattler T., Wodak E., Schmoll F. (2015). Evaluation of the specificity of a commercial ELISA for detection of antibodies against porcine respiratory and reproductive syndrome virus in individual oral fluid of pigs collected in two different ways. *BMC Vet. Res.*, 11: 70.
- Schnapper A., Uhr G., Meyer W. (2003). Growth kinetics of porcine lymphatic organs during early postnatal life. *Anat. Histol. Embryol.*, 32: 297–304.
- Schultz R. (2006). Transfer of humoral and cellular immunity through colostrum. *Proc. Meril European Vaccinology Symposium*. 58.
- Šinkora M., Butler J.E. (2009). The ontogeny of the porcine immune system. *Dev. Comp. Immunol.*, 33: 273–283.
- Šinkora M., Sinkora J., Reháková Z., Splíchal I., Yang H., Parkhouse R.M., Trebichavský I. (1998 a). Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. *Immunology*, 95: 595–603.
- Šinkora J., Reháková Z., Sinkora M., Cukrowska B., Tlaskalová-Hogenová H., Bianchi A.T., De Geus B. (1998 b). Expression of CD2 on porcine B lymphocytes. *Immunology*, 95: 443–449.
- Šinkora J., Reháková Z., Sinkora M., Cukrowska B., Tlaskalová-Hogenová H. (2002). Early development of immune system in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 87: 301–306.
- Solano-Aguilar G.I., Vengroski K.G., Beshah E., Douglass L.W., Lunney J.K. (2001). Characterization of lymphocyte subsets from mucosal tissues in neonatal swine. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 245–263.
- Splíchal I., Bonneau M., Charley B. (1994). Ontogeny of interferon alpha secreting cells in the porcine fetal hematopoietic organs. *Immunol. Lett.*, 43: 203–208.
- Springer S., Selbitz H.J. (1999). The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *Clostridium perfringens* toxoid vaccine. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 24: 333–336.
- Stepanova H., Samankova P., Leva L., Sinkora J., Faldyna M. (2007). Early postnatal development of the immune system in piglets: the redistribution of T lymphocyte subsets. *Cell Immunol.*, 249: 73–79.
- Talker S.C., Käser T., Reutner K., Sedlak C., Mair K.H., Koinig H., Graage R., Viehmann M., Klingler E., Ladinig A., Ritzmann M., Saalmüller A., Gerner W. (2013). Phenotypic maturation of porcine NK- and T-cell subsets. *Dev. Comp. Immunol.*, 40: 51–68.
- Trebichavský I., Splíchal I., Barot-Ciorbaru R. (1995). Expression of TNF-alpha in pig fetal cells stimulated in vitro. *Folia Microbiol. (Praha)*, 40: 417–420.
- Trebichavský I., Tlaskalová H., Cukrowska B., Splíchal I., Šinkora J., Oeháková Z., Šinkora M., Pospíšil R., Kováčová F., Charley B., Binns R., White A. (1996). Early ontogeny of immune cells and their functions in the fetal pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 54: 75–81.
- Trevisan G., Jablonski E., Angulo J., López W.A., Linhares D.C.L. (2019). Use of processing fluid samples for longitudinal monitoring of PRRS virus in herds undergoing virus elimination. *Porcine Health Manag.*, 5: 18.
- Tuboly S., Bernáth S., Glávits R., Kovács A., Megyeri Z. (1995). Intestinal absorption of colostral lymphocytes in newborn lambs and their role in the development of immune status. *Acta Vet. Hung.*, 43: 105–115.
- Turlewicz-Podbielska H., Włodarek J., Pomorska-Mól M. (2020). Noninvasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 32: 503–512.
- Wagstrom E.A., Yoon K.J., Zimmerman J.J. (2000). Immune components in porcine mammary secretions. *Viral Immunol.*, 13: 383–397.
- Ward L.A., Rich E.D., Besser T.E. (1996). Role of maternally derived circulating antibodies in protection of neonatal swine against porcine group A rotavirus. *J. Infect. Dis.*, 174: 276–282.
- Williams P.P. (1993). Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostral leukocytes by neonatal pigs. *Can. J. Vet. Res.*, 57: 1–8.
- Yang W.C., Schultz R.D. (1986). Ontogeny of natural killer cell activity and antibody-dependent cell mediated cytotoxicity in pigs. *Dev. Comp. Immunol.*, 10: 405–418.

Received: 15 VII 2022

Accepted: 21 X 2022

RESEARCH

Open Access



Concentrations of selected immunological parameters in the serum and processing fluid of suckling piglets and the serum and colostrum of their mothers

Agata Augustyniak¹, Ewelina Czyżewska-Dors² and Małgorzata Pomorska-Mól^{1*}

Abstract

Background Blood sampling from neonatal piglets is related to multiple disadvantages. Therefore, a new, alternative matrix is required to assess piglets' early immune status efficiently. The present study aimed to assess the usefulness of processing fluid for determining selected piglets' immune parameters. 264 pigs – 31 sows, 146 male piglets, and 87 female piglets from commercial indoor farrow-to-finish pig herd were included in this study. 264 serum, 31 colostrum, and 146 processing fluid samples were collected. Serum was collected from all animals, colostrum was collected from sows, and processing fluid was collected from male piglets only. Using commercial ELISA tests, the concentration of various immunoglobulins, cytokines, and acute phase proteins was assessed in each matrix. Statistical analyses were employed to determine differences in the concentration of measured indices between piglets' serum and processing fluid and correlations in the concentration of tested indices between particular sets of matrices.

Results Statistical analyses did not reveal significant differences in the IgG, IgA, IL-1 β , IL-4, IL-6, and IFN- γ concentration between piglets' serum and processing fluid ($p > 0.05$). A positive correlation ($p < 0.05$) regarding the concentration of some indices between processing fluid and samples collected from sows was also observed.

Conclusions Processing fluid can be considered a promising alternative to blood for assessing some immunological indices in piglets, such as IgG, IgA, IL-1 β , IL-4, IL-6, and IFN- γ , and, possibly, in the indirect assessment of some indices in lactating sows, including IgA, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ , or Pig-MAP.

Keywords Pigs, Neonate, Immunoglobulins, Cytokines, Acute phase proteins, Matrices, Processing fluid

*Correspondence:

Małgorzata Pomorska-Mól
mpomorska@up.poznan.pl

¹Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Poznań
University of Life Sciences, Wołyńska 35, Poznań 60-637, Poland

²Department of Internal Diseases and Diagnostics, Poznań University of
Life Sciences, Wołyńska 35, Poznań 60-637, Poland



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Blood and serum are the most common matrices for monitoring the pigs' health status. However, blood collection from newborn piglets is a labour-intensive and time-consuming method [1]. Moreover, it is stressful for piglets and may negatively affect their welfare [1]. Importantly, blood sampling from piglets, especially during their first days of life, carries a high mortality risk [1]. Due to these reasons, early monitoring is often postponed until the later stages of piglet life. In consequence, detecting possible disorders can be delayed. For example, inadequate colostrum intake is one of the significant reasons for neonatal piglets' mortality and may negatively influence piglets' weight gain [2, 3].

Given the above and the importance of piglets' immune status for further development and health, identifying samples that are easy to collect during the first day of life and cost-effective is desirable. Examples of such alternative matrices are oral fluid (OF) and processing fluid (PF). OF has already been approved for the detection of antibodies and pathogen genetic material in swine [4]. However, its utility in piglets is doubtful, as OF collection from pigs younger than one week is almost impossible. In this case, PF seems to be a much more promising alternative. PF usually consists of blood and tissue fluids recovered from castrated testicles and docked tails during piglet processing (3–5 days of age) [5]. The abovementioned processing procedures are routinely performed on many pig farms worldwide [6]. Thus, collecting such samples does not require additional effort and does not generate excessive stress for piglets. The available studies indicate that PF can be a promising, practical, and inexpensive sample that improves the herd monitoring of, among others, PRRS or PCV2 [7, 8]. Therefore, it is reasonable to assume that PF can be a practical tool for other purposes, such as assessing piglets' immune components.

It is hypothesised that PF can be used as an alternative sample to serum for the early assessment of porcine immune status. There is no data concerning the utility of PF as the matrix to evaluate immunological parameters such as immunoglobulins (Ig), cytokines, or acute phase proteins (APP). Therefore, the objective of the current study was to evaluate the usefulness of PF compared to serum for the detection of Ig (IgG, IgA, IgM), cytokines (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, INF- γ , and TNF- α) and APP (haptoglobin (Hp), C-reactive protein (CRP), pig major acute phase protein (Pig-MAP) and serum amyloid A (SAA)). In addition, the correlation between the concentration of tested parameters in samples collected from sows and their litters was investigated.

Results

Immunoglobulins

All tested Ig classes were detected in analysed matrices (concentration range for sows' serum: 16.6–36.46, 4.29–12.64, and 0.89–2.65, for male piglets' serum: 9.6–32.84, 0.45–1.7, and 0.71–3.99, for female piglets' serum: 10.02–29.66, 0.57–1.69, and 0.71–3.17, for PF: 2.56–31.28, 0.39–1.94, and 0.61–4.35, for colostrum: 12.4–39.27, 2.45–10.34, and 3.1–18.8, respectively for IgG, IgM and IgA, all values in mg/mL). IgG reached the highest concentration in all tested samples (Fig. 1). No significant differences were found between IgG content in PF and male piglets' serum ($p=0.77$), PF and female piglets' serum ($p=0.57$), and male and female piglets' serum ($p=0.78$; Fig. 1). A weak positive correlation was detected only between the IgG concentration in sows' sera and female piglets' sera (Table 1).

The concentration of IgA in all tested matrices was second to IgG, except for sows' serum in which IgA was the least concentrated one (Fig. 1). No significant differences between the concentration of IgA in the PF and the sera of male ($p=0.93$) and female ($p=0.15$) piglets were observed (Fig. 1C). No differences were identified between IgA levels in the serum of male and female piglets ($p=0.78$; Fig. 1C). A weak but statistically significant correlation between the IgA concentration in sows' serum and colostrum was observed (Table 1). Moreover, the concentration of IgA in sows' serum was positively correlated with its concentration in PF and female piglets' sera (Table 1). No statistically significant correlation was observed regarding the IgA concentration in the rest of the analysed matrices (Table 1).

The second most concentrated Ig in the sera collected from sows was IgM (Fig. 1B). In the remaining matrices, the concentration of IgM was, however, exceeded not only by the level of IgG but also by IgA (Fig. 1). The piglets' serum of both genders showed similar amounts of IgM ($p=0.83$). However, significant differences were detected between PF and sera of male ($p=0.00001$) and female ($p=0.00001$) piglets (Fig. 1B). No significant correlations between concentrations of IgM in different matrices were found ($p>0.05$; Table 1).

Cytokines

The presence of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, and INF- γ was confirmed in all types of tested matrices (concentration range of IL-1 β (pg/mL) was as follows: for sows' serum: 310.02–6895.00, for male piglets' serum: 122.01–4674.00, for female piglets' serum: 127.3–5234.6, for PF: 192.73–4691.2, for colostrum: 397.37–7976.00. The concentration range of IL-4 (pg/mL) was as follows: for sows' serum: 5.22–567.4, for male piglets' serum: 1.5–578.00, for female piglets' serum: 1.5–601.4, for PF: 1.59–569.00, for colostrum: 7.75–506.2. For IL-6 (pg/mL), the

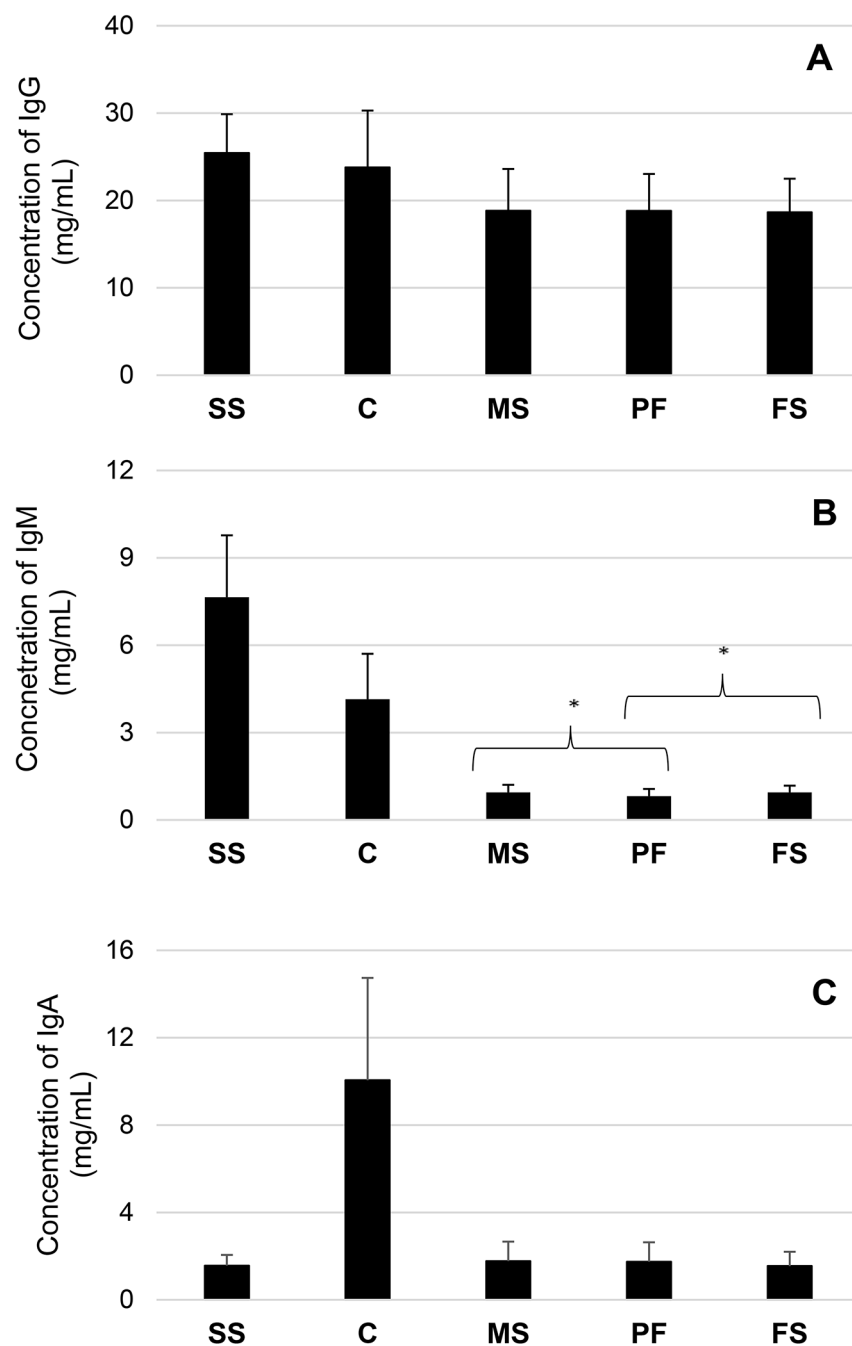


Fig. 1 (A-C) The mean concentration ($\pm$ SD) (mg/ml) of immunoglobulins: IgG, IgM, IgA in tested samples. SS – sows serum, C – colostrum, MS – male piglets' serum, PF – processing fluid, FS – female piglets' serum

minimum and maximum concentration were equal: for sows' serum 332.66–2310.7, for male piglets' serum: 56.8–2266.4, for female piglets' serum 82.67–2378.4, for PF 67.5–2398.2 for colostrum 289.32–2247.4, IL-8 (pg/mL) for sows' serum 25.96–301.12, for male piglets' serum: 23.24–319.33, for female piglets' serum 21.07–316.83, for PF 42.29–573.14, for colostrum 333.4–1964.98, for INF- γ (ng/mL) for sows' serum 0.59–13.65, for male piglets'

serum: 0.5–11.18, for female piglets' serum 0.5–10.57; for PF 0.5–10.5; for colostrum 0.54–9.51. TNF- α was detected only in sows' serum (range: 28–210 pg/ml) and colostrum (range 22–360 pg/ml). Out of all tested cytokines, IL-1 β was the most abundant cytokine in the PF (Fig. 2A). In the remaining types of samples, IL-1 β concentration was second to IFN- γ only (Fig. 2). No significant differences in the IL-1 β concentration in PF and sera

Table 1 The correlations (R-Spearman coefficient) between tested matrices in the IgG, IgM, and IgA concentrations. Brackets contain *p*-values for each correlation

	Immunoglobulins					
	IgG		IgA		IgM	
Matrice	Sows' serum	Colostrum	Sows' serum	Colostrum	Sows' serum	Colostrum
Colostrum	-0.13 (<i>p</i> =0.49)	1	0.39* (<i>p</i> =0.03)	1	0.04 (<i>p</i> =0.83)	1
Male piglets' serum	0.02 (<i>p</i> =0.85)	0.14 (<i>p</i> =0.09)	0.14 (<i>p</i> =0.09)	-0.12 (<i>p</i> =0.16)	-0.00 (<i>p</i> =0.98)	0.05 (<i>p</i> =0.57)
Processing fluid	-0.08 (<i>p</i> =0.35)	-0.04 (<i>p</i> =0.62)	0.25* (<i>p</i> =0.00)	-0.10 (<i>p</i> =0.23)	-0.08 (<i>p</i> =0.31)	0.04 (<i>p</i> =0.59)
Female piglets' serum	0.23* (<i>p</i> =0.03)	0.16 (<i>p</i> =0.13)	0.54* (<i>p</i> =0.00)	-0.12 (<i>p</i> =0.05)	-0.06 (<i>p</i> =0.59)	0.04 (<i>p</i> =0.70)

*Correlation is significant (*p*<0.05)

Table 2 The correlations (R-Spearman coefficient) in the concentration of IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IFN-γ, and TNF-α between tested matrices. Brackets contain *p*-values for each correlation

	Cytokines									
	IL-1β		IL-4		IL-6		IL-8		INF-γ	
Matrices	Sows' serum	Colostrum	Sows' serum	Colostrum	Sows' serum	Colostrum	Sows' serum	Colostrum	Sows' serum	Colostrum
Colostrum	0.89* (<i>p</i> =0.00)	1	0.86* (<i>p</i> =0.00)	1	0.78* (<i>p</i> =0.00)	1	0.09 (<i>p</i> =0.62)	1	0.84* (<i>p</i> =0.00)	1
Male piglets' serum	0.75* (<i>p</i> =0.00)	0.80* (<i>p</i> =0.00)	0.71* (<i>p</i> =0.00)	0.79* (<i>p</i> =0.00)	0.65* (<i>p</i> =0.00)	0.67* (<i>p</i> =0.00)	0.18* (<i>p</i> =0.03)	-0.23* (<i>p</i> =0.01)	0.61* (<i>p</i> =0.00)	0.81* (<i>p</i> =0.00)
Processing fluid	0.76* (<i>p</i> =0.00)	0.78* (<i>p</i> =0.00)	0.74* (<i>p</i> =0.00)	0.79* (<i>p</i> =0.00)	0.57* (<i>p</i> =0.00)	0.62* (<i>p</i> =0.00)	0.20* (<i>p</i> =0.02)	-0.10 (<i>p</i> =0.24)	0.57* (<i>p</i> =0.00)	0.76* (<i>p</i> =0.00)
Female piglets' serum	0.70* (<i>p</i> =0.00)	0.76* (<i>p</i> =0.00)	0.87* (<i>p</i> =0.00)	0.91* (<i>p</i> =0.00)	0.72* (<i>p</i> =0.00)	0.69* (<i>p</i> =0.00)	0.20 (<i>p</i> =0.07)	-0.42* (<i>p</i> =0.00)	0.78* (<i>p</i> =0.00)	0.89* (<i>p</i> =0.00)

*Correlation is significant (*p*<0.05)

of male (*p*=0.20) and female (*p*=0.73) piglets were demonstrated (*p*>0.05; Fig. 2A). Differences were also not identified between IL-1β concentrations in piglet sera of both genders (*p*=0.19). IL-1β concentrations were correlated across multiple matrices (Table 2).

The mean concentration of IL-4 prevailed over IL-8 in the sera of all analysed groups (Fig. 2). In the colostrum and PF, its concentration was lower compared to IL-8 (Fig. 2). Similarly to the previously described parameter, no significant differences between the concentration of IL-4 in PF and the sera of male (*p*=0.59) and female (*p*=0.41) piglets were observed (Fig. 2B). IL-4 concentration was also similar in the male and female piglets' sera (*p*=0.73; Fig. 2B). Significant correlations between the concentration of IL-4 were determined between all tested sets of matrices (Table 2).

IL-6 was the third most concentrated cytokine in each kind of matrix (Fig. 2). Its concentration in PF and sera of male (*p*=0.55) and female (*p*=0.14) piglets did not differ significantly (Fig. 2D). The level of IL-6 in the male and female piglets' sera was also similar (*p*=0.07). Significant correlations in the concentration of IL-6 were determined between all sets of tested matrices (Table 2).

In colostrum and PF, the mean concentration of IL-8 exceeded IL-4 (Fig. 2). The concentrations of IL-8 significantly differ between PF and sera of male (*p*=0.00) and female (*p*=0.00) piglets (Fig. 2E). No significant

differences between IL-8 concentration in the sera of piglets belonging to opposite genders (*p*=0.89; Fig. 2E) were found. Several correlations regarding the concentration of IL-8 in different matrices were identified (Table 2). Detected correlations concerning IL-8 concentration between different matrices were the weakest out of all analysed cytokines (Table 2).

In each type of examined matrix, except for PF, INF-γ was the most abundant cytokine (Fig. 2C). No significant differences between the concentration of INF-γ in the PF and the sera of male (*p*=0.12) and female (*p*=0.11) piglets were observed (Fig. 2C). No differences were identified between INF-γ levels in the serum of male and female piglets (*p*=0.77; Fig. 2C). Significant, positive correlations between every tested set of matrices were demonstrated for this cytokine (Table 2).

Due to the undetectable concentration of TNF-α in three out of five tested matrices, further statistical analyses of this parameter were infeasible (Fig. 2F).

Acute phase proteins

The concentration range of tested acute phase proteins (respectively for Hp (mg/mL), Pig-MAP (μg/ml) and CRP (μg/ml)) was as follow: for sows' serum: 0.79–2.29, 484.71–1391.8, and 7.89–61.49, for male piglets' serum: 0.29–1.56, 379.9–1471.00, and 4.69–29.62, for female piglets' serum: 0.25–8.81, 372.97–1537.3, and 5.25–38.11, for

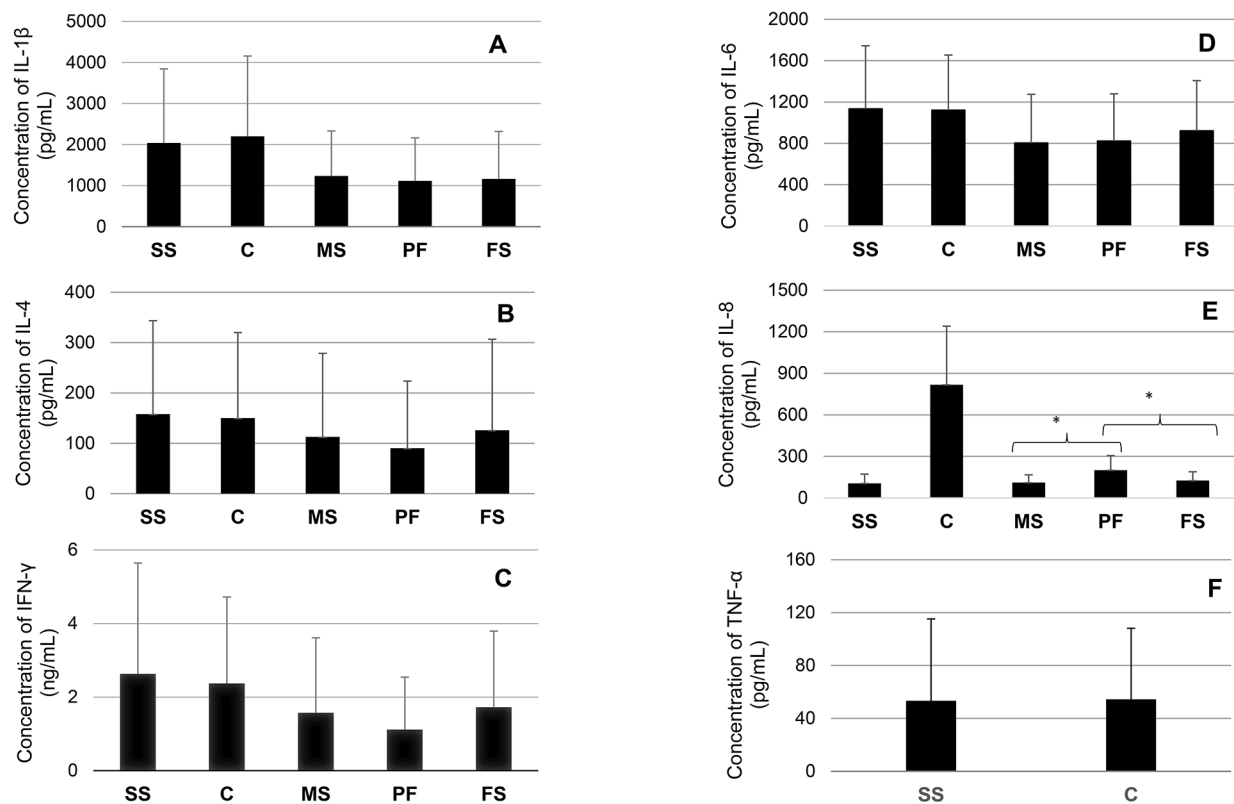


Fig. 2 (A-F) The mean concentration ($\pm$ SD) (mg/ml) of cytokines: IL-1 β , IL-4, IFN- γ , IL-6, IL-8, TNF- α in tested samples. SS – sows serum, C – colostrum, MS – male piglets' serum, PF – processing fluid, FS – female piglets' serum

PF 0.06–1.41, 372.49–1060.6, and 4.72–25.59, for colostrum 1.56–3.89, 457.4–1265.2, and 8.97–66.41.

Among analysed APPs, CRP had the lowest abundance in each tested matrix (Fig. 3). The concentration of CRP reached the highest concentration in sows' serum and colostrum. In contrast, the lowest was in the PF (Fig. 3A). Statistically significant differences concerning CRP concentration were detected between the PF and sera of male ($p=0.00$) and female ($p=0.00$) piglets (Fig. 3A). Such differences were also demonstrated between the sera of male and female piglets ($p=0.00$; Fig. 3A). Statistically significant correlations in the level of this parameter were only detected between sows' serum and colostrum and between sera collected from sows and female piglets (Table 3).

Hp reached the highest concentration in each type of tested matrices, except for male piglets' sera (Fig. 3B). There were no statistically significant differences between the concentration of Hp in the sera collected from piglets of different genders ($p=0.32$; Fig. 3B). Also, the concentration of Hp in the sera of male piglets and PF did not differ significantly ($p=0.12$; Fig. 3B). However, significant differences were found in the case of sera obtained from female piglets and PF ($p=0.02$; Fig. 3B). Several positive

correlations between Hp concentrations in different matrices were found (Table 3).

Pig-MAP was the abundant APP of male piglets' serum (Fig. 3). In the remaining matrices, its mean concentration was second to the Hp (Fig. 3). The mean concentration of Pig-MAP in PF significantly differed from those measured in male ($p=0.00$) and female ($p=0.00$) piglets' serum (Fig. 3C). At the same time, differences were not observed between the sera of piglets belonging to opposite genders ($p=0.06$; Fig. 3C). A statistically significant correlation between all tested sets of matrices was observed (Table 3).

The concentration of SAA in most tested samples was below the test's detection limit (0.31 μ g/ml). SAA levels above the detection limit were found only in colostrum, with a mean concentration of 13.17 μ g/ml (± 4.04). Therefore, any statistical analyses of this parameter were infeasible to perform.

Discussion

Blood serum is the most routinely used sample to monitor pig immune status. Due to some disadvantages in its collection, alternative matrices are desirable. As castration is still routinely performed on numerous farms, PF obtained during these procedures piqued scientists'

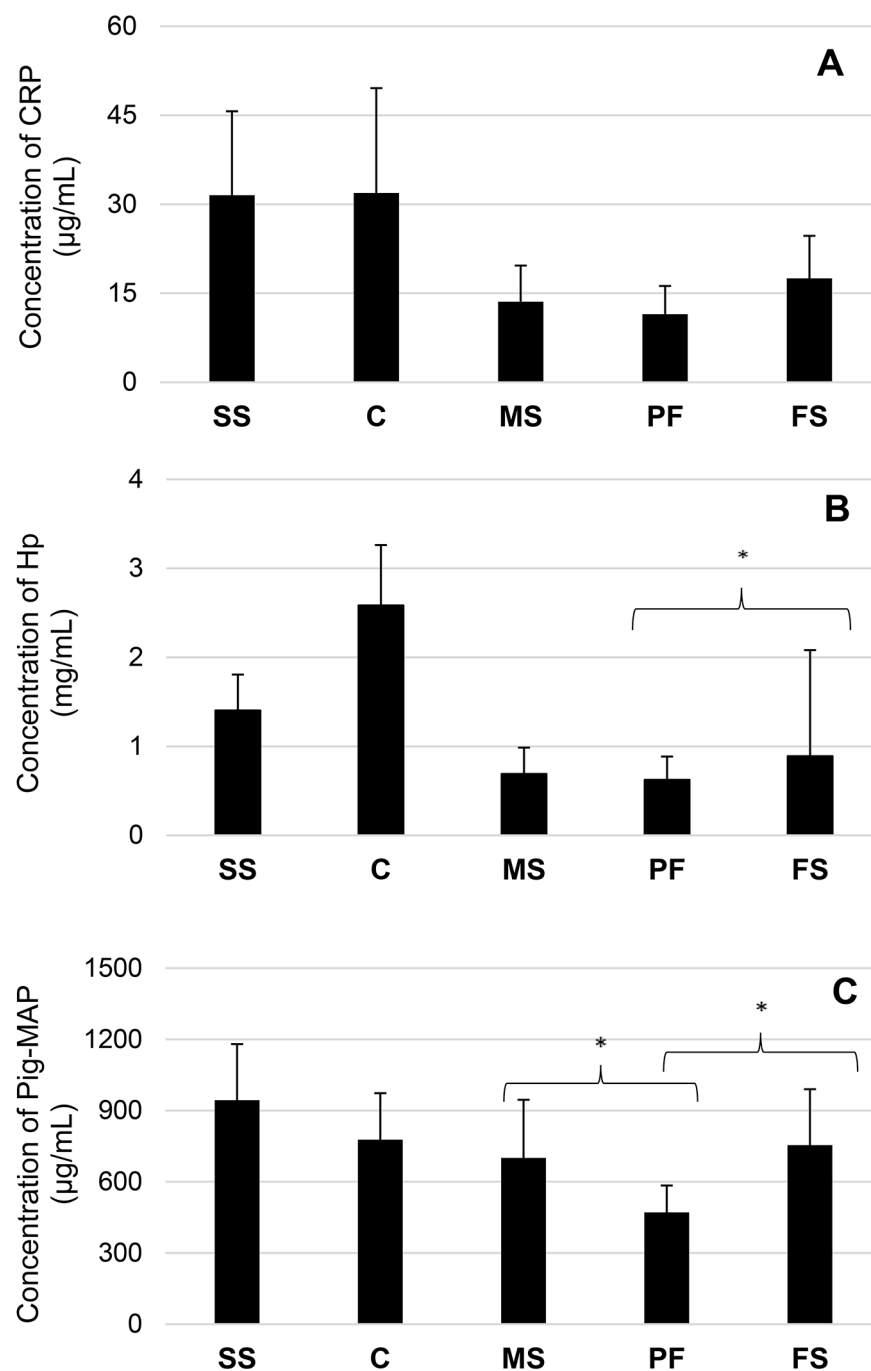


Fig. 3 (A-C) The mean concentration (± SD) (mg/ml) of particular acute phase proteins: CRP, Hp, Pig-MAP in tested samples. SS – sows serum, C – colostrum, MS – male piglets' serum, PF – processing fluid, FS – female piglets' serum; * - statistically significant differences

interest as a possible alternative. The results of several studies indicate that PF can be implemented in the monitoring of some pigs' diseases. The usefulness of PF regarding the surveillance of swine diseases was initially assessed for PRRS [5]. The results of several studies showed that PF can be an efficient, cost- and work-saving alternative sample for PRRS monitoring in breeding

herds [5, 9, 10]. The available data indicate that PF can also be applicable in PCV-2, PED, or Mhp monitoring [7, 8, 11]. Therefore, we hypothesised that the PF can be successfully employed for more diagnostics purposes, such as early assessment of porcine neonates' immunological status.

Table 3 The correlations (R-Spearman coefficient) in CRP, haptoglobin, and Pig-MAP concentration between tested matrices. Brackets contain *p*-values for each correlation

	Acute phase proteins					
	CRP		Hp		Pig-MAP	
Matrices	Sows' serum	Colostrum	Sows' serum	Colostrum	Sows' serum	Colostrum
Colostrum	0.78* (<i>p</i> =0.00)	1	0.45* (<i>p</i> =0.01)	1	0.4* (<i>p</i> =0.03)	1
Male piglets' serum	0.02 (<i>p</i> =0.82)	0.04 (<i>p</i> =0.63)	0.02 (<i>p</i> =0.84)	0.17* (<i>p</i> =0.04)	0.36* (<i>p</i> =0.00)	0.57* (<i>p</i> =0.00)
Processing fluid	0.09 (<i>p</i> =0.26)	0.11 (<i>p</i> =0.2)	0.08 (<i>p</i> =0.32)	0.16* (<i>p</i> =0.047)	0.09 (<i>p</i> =0.23)	0.32* (<i>p</i> =0.00)
Female piglets' serum	0.26* (<i>p</i> =0.01)	0.11 (<i>p</i> =0.32)	0.05 (<i>p</i> =0.65)	0.37* (<i>p</i> =0.00)	0.23* (<i>p</i> =0.03)	0.42* (<i>p</i> =0.00)

*Correlation is significant (*p*<0.05)

Due to the epitheliochorial structure of the porcine placenta, the colostrum represents the sole source of passive immunity for piglets; the concentration of IgG in the piglets' plasma at the age of 24 h is strongly correlated with colostrum intake [2]. Ig are crucial in conferring protection to piglets by the time they develop their immunity, so from an immunological point of view, they are the essential component of porcine colostrum. In the present study, the concentration of IgG, IgM, and IgA in various matrices, including PF, were evaluated, and correlations and differences between these concentrations were analysed. The results were consistent with previous studies in which IgG is the predominant Ig of porcine colostrum. It was followed by IgA and IgM, the least concentrated ones [3, 12–14]. The observed patterns of the mean concentration of tested Ig in sows' sera, where IgG and IgA are the most and least concentrated, are also consensual with previously obtained results [15]. Consistent with previous studies, IgG was also the dominant Ig of piglets' sera [3, 14]. Bandrick et al. (2014) showed that concentrations of IgG and IgA were higher in colostrum than in sows' serum [16]. In the present study, colostrum contained a higher concentration of IgA. However, a greater concentration of IgG was determined in sows' serum. Such differences can result from the timing of colostrum collection. In the present study, colostrum was obtained from 12 to 24 h from the start of parturition. In the study of Bandrick et al. (2014), it was collected within 1 h from the beginning of farrowing [16]. It is well documented that the concentration of Ig in colostrum declines rapidly during the first 24 h after farrowing, with the most marked decrease in the level of IgG [12, 14]. The decrease in the level of IgA is less drastic compared to IgG, and IgA is the predominant Ig of porcine milk [12, 14]. Moreover, more than 50% of IgA originates from the mammary gland; meanwhile, almost 100% of IgG is of serum origin [6]. The most prevalent Ig of PF was IgG, which IgA followed. The present study did not determine statistically significant differences regarding the concentration of IgG and IgA in the sera collected from piglets belonging to both genders and in PF. The results suggest that PF can be a reliable alternative to piglet serum for assessing the level of IgG and IgA. A slight

positive correlation between the amount of IgA in the PF and the sows' serum implies that PF can potentially be a helpful matrix in assessing the sows' status regarding this Ig (R-Spearman=0.25; *p*<0.05). This statement, however, needs more studies on a larger population of animals. No correlation between the level of IgA in the PF, as well as serum collected from both genders of piglets vs. colostrum, was observed, which is interesting because most of the colostral IgA is produced locally in the mammary gland, and a lesser part is of serum origin [6]. This phenomenon may result from different times of taking samples. The correlation between PF and sows' serum was not detected for IgG, almost wholly derived from sows' serum [6]. We observed a moderate positive correlation between the level of IgA in the serum of sows and their colostrum. On the other hand, a study by Markowska-Daniel et al. (2010) did not show any correlation between IgA levels in these matrices [14]. The mentioned differences can result from the timing of sample collection. In the quoted research, the blood was sampled from sows 10 and 3 days before parturition, while in the present study, during 12–24 h after start of parturition [14]. No correlation between the concentration of IgG in sows' serum and colostrum was detected, which aligns with previous results [14]. The lack of such correlation regarding IgG could result from the transfer of IgG from serum to colostrum, which depends not only on the IgG concentration in sows' serum but also on some other factors, including season, genotype, vaccination, or earlier transfer of IgG from sows' serum to colostrum, as the tight junctions between mammary gland cells are already open during the last month of gestation and enable the extensive transfer of Ig [14, 17]. In the present study, we observed high SD values concerning the mean concentration of IgG in sows' serum and colostrum and IgA in colostrum, which resulted from high individual variability and could also influence statistical results. According to Bandrick et al. (2014), piglets' serum concentration of IgG and IgA after ingestion of colostrum mimicked the distribution of these immunoglobulins in the sow's colostrum [16]. The results of our study did not show a significant correlation between the concentration of IgG and IgA in the sera of piglets and colostrum, which is

consensual with some previous results [14, 18]. The lack of such a relation is thought to be due to factors that can affect Ig concentration in the piglets' sera, including the size of the litter, birth order, and gut closure timing [14]. On the other hand, another study showed a clear correlation between IgG concentration in these two matrices [19]. Nevertheless, this relationship was observed between colostrum obtained after the expulsion of the first piglet and before the first suckling and sera collected from piglets one-day following farrowing [19]. Concerning IgM, statistically significant differences were found between its amount in PF and serum obtained from piglets of both genders. The above implies that PF is unlikely an alternative to serum in the early assessment of IgM concentration in piglets. Of note, IgM is the least concentrated Ig of porcine colostrum. Therefore, in the early assessment of porcine neonate immune status, IgG and IgA seem of greater relevance. PF might be thus considered an alternative matrix for piglet IgG and IgA concentration assessment.

Multiple cytokines were detected in the porcine colostrum [3, 20, 21]. Similarly to the Ig, most cytokines are delivered for offspring via colostrum. It is thought that they play an instructive role in the maturation process of neonatal immunity [20]. Our results regarding the concentration of particular cytokines in the sows' serum and colostrum differ from previous research in which the most abundant cytokine in the porcine colostrum and sows' serum was IL-4 [20]. In the present study, the most abundant cytokines in these two matrices were IFN- γ , IL-1 β , and IL6; meanwhile, IL-4 was one of the least concentrated ones in the tested matrices. As IFN- γ , IL-1 β , and IL6 are classified as pro-inflammatory cytokines, such differences can indicate and result from some ongoing inflammation processes. However, the differences between the IL-6 amounts in these two studies were not enormous, while in the study of Nguyen et al. (2007), the concentration of IL-1 β was not assessed [20]. Moreover, in the present research, TNF- α , also associated with inflammation, was detected in the sows' serum but was absent in the study of Nguyen et al. (2007) [20]. Nguyen et al. (2007) hypothesise that TNF- α present in colostrum is produced locally in the mammary gland and does not originate from sows' circulation [20]. In the study of Maciag et al. (2022), the predominant cytokine of sows' serum was INF- γ , consistent with our results [3]. In the quoted study, the highest concentrated cytokine of sows' colostrum was IL-4, which, on the other hand, is in line with the results obtained by Nguyen et al. (2007) [3, 20]. The content of cytokines in piglets' sera detected in our study was also different compared to the study of Nguyen et al. (2007). Contrary to our research, in which IFN- γ , IL-1 β , and IL-6 reached the highest concentration in piglets' sera, in the quoted study, the most abundant

cytokine of suckling piglets' serum was IL-4, which was followed by TGF- β [20]. Piglets do not produce endogenously other cytokines, except IL-12 and TGF- β 1 [20]. Additionally, cytokines do not cross the placenta [20]. Therefore, observed differences seem understandable, as colostrum constitutes the sole source of particular cytokines [20]. In the study of Maciag et al. (2022), the most concentrated cytokine of piglets' sera was IFN- γ , followed by IL-4 [3]. The most significant differences compared to our results were presented in the Llamas Moya et al. (2007) study, in which the piglets' plasma concentration of IL-1 β was much lower compared to our results (<290 pg/ml) [22]. Moreover, the presence of TNF- α was detected in the piglets' sera [22]. The minimum and maximum concentrations of TNF- α were observed at one day and five days of age, respectively [22]. Of note, neither the present nor any other results detect TNF- α in the piglets' serum [20]. No significant differences regarding the concentration of IL-1 β , IL-4, IL-6, and IFN- γ between PF and piglets sera and between sera collected from piglets of both genders were found in the present study. The above implies that PF can represent a promising alternative for blood in assessing these cytokine concentrations in neonatal piglets. Similar results were reported in the previous study, where the correlation in the concentrations of IFN- γ , IL-4, and IL-6 in sows' serum and colostrum has been noted [20]. Therefore, concerning these cytokines, it can be assumed that its sows' serum concentrations contribute to its level of mammary secretion [20]. Regarding sows' serum and colostrum, we have also observed a positive correlation of IL-1 β concentration. Of note, its content was higher in colostrum compared to serum. Such correlation was not found for IL-8 concentration. Moreover, IL-8 content was higher in the colostrum compared to the sows' serum, suggesting that this cytokine does not originate solely from serum but can be produced locally in the mammary gland [20]. These findings, however, need further confirmation. Notably, the observed lack of correlations may result from cytokines' relatively short half-life and instability [20, 23]. The concentration of IL-8 in colostrum was negatively correlated with its level in piglet sera. The study performed on human colostrum indicates that cytokines in colostrum lose their stability depending on the combination of time and the temperature in which it is stored [24]. Concerning INF- γ , IL- β , IL-4, and IL-6 concentrations, positive correlations were found between sera collected from piglets and sows and between piglets' sera and colostrum. Therefore, according to Nguyen et al. (2007) results, it can be assumed that piglets' serum concentration of these cytokines corresponds to the mother pattern [20]. Significant, strong correlations were found between the concentration of IL-1 β , IL-4, IL-6, and IFN- γ in PF and sows' serum and between IL-1 β , IL-4, IL-6, and

IFN- γ in PF and colostrum. This indicates that PF can be potentially useful in indirectly assessing mentioned cytokines. However, it should be in mind that regarding the concentrations of most tested cytokines, relatively high SD values were observed, which could affect the results of statistical analyses and influence the significance of observed results (Fig. 2).

Hp, Pig-MAP, SAA, and CRP are classified as positive, major pigs' APP [25]. They are produced and released due to pro-inflammatory cytokines activation in response to inflammation, which can be caused by infections, stress, or tissue injuries [26]. Therefore, APP can be a valuable indicator of health status disruption. Available data indicate an increased interest in APP as a health status marker that can be routinely used in pig production [26]. Concerning APP during the early stages of piglets' life, the literature data is less abundant than that of Ig. In line with several previous studies, the presence of Hp, Pig-MAP, and CRP was confirmed in colostrum and piglets' sera [27–29].

The mean concentration of CRP in the serum of piglets observed in the present study was similar to previously observed (17.51 $\mu\text{g/ml}$ in female piglets, 13.59 $\mu\text{g/ml}$ in male piglets vs. ~ 15 $\mu\text{g/ml}$) [22]. The amount of CRP in the piglets' serum does not vary with age within the first week of life [22]. It is well documented that the plasma CRP concentration increases rapidly after the inflammatory stimulus [30]. Herein, significant differences were determined between the concentration of CRP in piglets' serum of both genders and between piglets' serum and PF. Therefore, PF should not be considered a reliable matrix for assessing piglets' CRP concentration. Interestingly, a positive correlation between the amount of CRP was demonstrated for sera and saliva [31]. The present study detected no significant correlation between the amount of CRP in the colostrum and piglets' sera, which agrees with the previous results [29]. The amount of CRP in both matrices observed in the present study was much higher than the quoted one [29]. It is considered that the piglets' serum CRP content originates from colostrum at the 4 days of life [29].

The concentration of Hp in particular matrices was similar to those documented in the previous study, in which its content in the colostrum and sows' serum was 0.78–1.11 mg/ml and 2.58 mg/ml, respectively [28]. We observed, however, more significant differences in the concentration of Hp in the piglets' serum compared to a previous study, in which its concentration at 9 h post-partum in the serum of piglets that ingested colostrum was 271 ± 48.6 $\mu\text{g/ml}$ [28]. Such differences can result from blood collection timing. It was demonstrated that the concentration of plasma Hp in piglets increases within the first week of life [22, 27]. In the second experiment described in the quoted research, Hp concentration

was measured in the sera collected from piglets at 14 days and during weaning. The obtained results were much more comparable to ours (0.58 ± 0.04 mg/ml and 0.53 ± 0.04 mg/ml on the 14th day and at the weaning, respectively) [28]. Concerning Hp piglets' serum content, our results were different from those presented by Llamas Moya et al., in which the Hp amount in the piglets' plasma ranged from 0.6 to 1.2 ng/ml on the 3rd and 5th day of life, respectively [22]. It is worth adding that the observed differences may result from different designs of both experiments (commercial farm vs. controlled conditions), as environmental factors (dust, gases) influence the level of Hp [32]. Hp is of colostrum origin [28].

Moreover, colostrum increases its piglets' endogenous production [28]. A positive correlation between the Hp amount in colostrum and piglets' serum observed in the present study is consistent with the above finding. We also found a positive correlation between colostrum and sows' serum, which may indicate that the level of Hp in the colostrum depends on its level in the sows' blood. However, such a relationship was not determined between the sera of sows and their offspring or sows' serum and PF. Positive correlations of Hp levels were also observed in other matrices, like serum and meat juice, and between serum and saliva [26, 31]. Despite the lack of statistically significant differences between the amount of Hp in sera collected from piglets of both genders, we confirmed such differences concerning PF and female piglets' sera. These findings can result from more pronounced inter-female piglet variability regarding Hp content in female sera. Therefore, PF is unsuitable for determining the Hp content in piglets.

The data concerning Pig-MAP during the perinatal period of suckling piglets needs to be revised. Using a Western blot technique, Martin et al. (2005) have determined, among others, the presence of 120 kD bands in colostrum and piglets' serum corresponding to the native Pig-MAP/ITIH4 protein [27]. Based on these findings, the authors suggested that colostrum could be, at least in part, a source of piglets' blood Pig-MAP [27]. We have detected Pig-MAP's presence in each tested specimen, including colostrum and piglets' sera. Moreover, we have determined a positive correlation between the Pig-MAP amount in colostrum and piglets' sera. Therefore, the present results confirm the observation of Martin et al. (2005). A positive correlation in the current study between sows' serum and colostrum may indicate that colostrum Pig-MAP is of serum origin.

Furthermore, a significant relationship between sows' and piglets' serum suggests that the concentration of this APP in the sows' circulation influences its concentration in piglets. Concerning other alternatives to serum matrices, a positive correlation in the content of Pig-MAP was found between meat juice and serum [26]. The Pig-MAP

concentration in PF significantly differed from the concentration measured in the piglets' serum of both genders. Of note, the SD values regarding Pig-MAP in this study were high, which could affect the results of statistical analyses. Therefore, the utility of PF for assessing the concentration of Pig-MAP requires further research.

Conclusion

To the authors' knowledge, this is the first report in which the presence of Ig, cytokines, and APP was confirmed in PF. Due to the lack of significant differences between the concentration of IgG, IgA, IL-1β, IL-4, IL-6, and IFN-γ in the serum of piglets and PF, it can be assumed that PF represents a promising alternative to blood for their assessment in suckling piglets. Moreover, due to correlations between IgA, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IFN-γ concentrations in sows' serum and PF and Pig-MAP concentrations in colostrum and PF, PF can potentially represent a valuable and relevant matrix for the indirect assessment of sows' immune parameters. Since this is the first study evaluating the PF as a potential matrix for evaluating piglets' and sows' immune status, further analyses are desirable.

Methods

Animals

The study was conducted on a farrow-to-finish pig herd of 100 sows (Danbred hybrid). The animals were privately owned by the farmer. Samples were collected from 264 pigs (31 sows, 146 male piglets, and 87 female piglets). Lots of 9–10 sows were formed every 21 d. Sows and suckling piglets were kept in a well-prepared farrowing room. There was no cross-fostering of piglets within

piglets in this study. An all-in/all-out swine production system with thorough cleaning and disinfection in between lots was implemented routinely on this farm. Standard farm management included castration and tail docking at 3–5 days and weaning at 4 weeks of age. Only sows between 2 and 4 parities, weighed 150–200 kg, and farrowing without assistance, at least 10 piglets were included in this study. The herd's routine health monitoring program included serological profiling and colostrum quality analysis.

Based on serology test results, the herd was confirmed seronegative to pseudorabies virus (PRV), PRRSV, influenza A virus (IAV), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp). Clinical, and anatomopathological examinations (regularly performed ante-mortem inspection of carcass at slaughterhouse) showed no evidence of streptococcosis, pleuropneumonia, Glasser's disease, or atrophic rhinitis. The breeding sows were vaccinated against porcine parvoviral infection, erysipelas, atrophic rhinitis and colibacillosis of newborn piglets.

Samples collection and processing

Thirty-one colostrum samples, one from each sow, were collected between 12 and 24 h after the start of farrowing. Therefore, regarding sampling time, the analysed colostrum was middle-late, which could influence the concentration of measured indices and obtained results. All samples were transported to a laboratory in a cooler condition and then refrigerated until further analyses. Blood was collected from the *vena jugularis* or *vena cava cranialis* into clot activator tubes. Blood from sows was collected simultaneously to colostrum (12–24 h after the farrowing onset). Sampling of piglets took place 2–5 days after farrowing (at the time of piglets processing). Samples were collected from at least seven piglets from each litter. A total of 31 sows' serum samples, 146 male serum and PF samples, and 87 female serum samples were included in the present study. Blood was centrifuged (2500 x g, 15 min, 4°C) to obtain serum and kept frozen (-80°C) until further analyses. After the experiment, the pigs were released for rearing.

Laboratory analyses

IgA, IgG, and IgM concentrations in serum, colostrum, and PF were analysed using species-specific commercial ELISA kits (Porcine Immunoglobulin G, IgG ELISA Kit, Porcine Immunoglobulin A, IgA ELISA Kit, Porcine Immunoglobulin M, IgM ELISA Kit) from BT Laboratory (Jiaxing, Zhejiang, China). All tests were conducted according to the manufacturer's recommendations. Table 4 presents the dilution of each sample type used in the present study. The concentration of each parameter was calculated based on a standard curve for each using

Table 4 Samples dilutions depending on the expected analyte concentration and the manufacturer's recommendation

Parameter	Sample	Dilution Factor
IgA	Serum, PF	No dilution
	colostrum	1:100
IgG	Serum, PF	No dilution
	colostrum	1:100
IgM	Serum, PF	No dilution
	colostrum	1:100
IFN-γ	Serum, PF, colostrum	1:2
TNF - α	Serum, PF, colostrum	1:2
IL-8	Serum, PF, colostrum	1:2
IL-6	Serum, PF, colostrum	1:2
IL-1β	Serum, PF, colostrum	1:2
IL-4	Serum, PF, colostrum	1:2
Pig-MAP	Serum, colostrum	1:1000
	PF	1:100
Hp	Serum, PF, colostrum	1:10 000
CRP	Serum, PF, colostrum	1:2000
SAA	Serum, PF, colostrum	1:400

Magellan v.7.2 software (Tecan). For all kits, the intra- and interassay CV were <8% and <10%, respectively. Detection limits were 0.022 mg/ml for IgM, 0.251 mg/ml for IgG, and 10.25 µg/ml for IgA.

The concentration of the following cytokines: TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, and IL-8 in serum, colostrum, and PF was determined with the use of commercial species-specific ELISA kits (RayBio® Porcine TNF-alpha ELISA Kit, RayBio® Porcine IFN-gamma ELISA Kit, RayBio® Porcine IL-1 beta ELISA Kit, RayBio® Porcine IL-4 ELISA Kit, RayBio® Porcine IL-6 ELISA Kit, RayBio® Porcine IL-8 ELISA Kit) from RayBiotech Inc (Norcross, GA, USA), following the manufacturer procedures. The concentration of analysed parameters was calculated based on a standard curve for each using Magellan v.7.2 software (Tecan). The intra- and interassay CV were <10% and <12% respectively. The minimum detectable concentration of cytokines were 6pg/ml (IL-1beta); 1.5pg/ml (IL-4), 45pg/ml (IL-6); 10pg/ml (IL-8), 20 pg/ml (TNF- α) and 500pg/ml (INF- γ).

The concentration of SAA, CRP, and Hp in serum, colostrum, and PF was determined with the use of commercial ELISA kits (Pig serum amyloid A ELISA, Pig haptoglobin ELISA, Pig C-reactive protein (CRP) ELISA) from Life Diagnostics Inc. (West Chester, PA, USA). Pig-MAP concentration in all matrices was determined with the ELISA kits (Acuvet ELISA PigMAP) from Acuvet Biotech SL (Zaragoza, Spain). The intra- and interassay CV for all Elisa assays used in this study were <10% and <12% respectively. Detection limits of test used were: 4,68 µg/mL for CRP, 0,05 mg/mL for Hp, 0,31 µg/ml for SAA and 0.18 µg/mL Pig-MAP. Inter and intra assays CV of the kits used in the study are lower than 10%. All tests were conducted according to the manufacturer's recommendations. The concentration of analysed parameters was calculated based on a standard curve for each using Magellan v.7.2 software (Tecan).

To ensure the precision of results, all samples were run in duplicate, and results were considered acceptable when the relative standard deviation was $\leq 10\%$. Repeatability and reproducibility ELISA tests used in our study performed at 3 concentration levels (if available) of analytes in PF and colostrum (negative samples, low and high concentration) yielded values below 9.5% CV for repeatability and below 11.5% CV for reproducibility. Accuracy was investigated by linearity under dilution; in brief, two PF and colostrum samples were diluted (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32) with sample diluents. Dilution studies resulted in linear regression equations with a correlation coefficient ranged from 0.97 to 0.99 showing that the tests measures the proteins in a linear manner.

Statistical analysis

All the data were analysed using Statistica 13.3 (Tibco, USA). The significance level was $\alpha=0.05$, and a p -value<0.05 was considered statistically significant. The obtained data were subjected to the W. Shapiro-Wilk test for normality and Levene's test for equality of variances. Due to the nonparametric distribution of the analysed variables, Spearmans' rank correlation coefficient test was used to determine the correlation between various matrices, i.e. sows' serum and piglets' serum, sows' serum and colostrum, piglets' serum and colostrum, sows' serum and PF, piglets' serum and PF, or colostrum and PF. Differences between mean concentrations of investigated parameters in PF vs. piglets serum and serum of females vs. serum of males were tested by a nonparametric U Mann-Whitney test.

Abbreviations

APP	Acute phase proteins
CRP	C – reactive protein
Hp	Haptoglobin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ig	Immunoglobulins
PF	Processing fluid
TNF	Tumour necrosis factor

Author contributions

A.A. – designing of the study, research on available knowledge about the topic, sample collection, laboratory analyses, interpretation of data, writing – original draft, writing – review & editing. E.C.D. – research on available knowledge about the topic, sample collection, interpretation of data, writing – review & editing. M.P.M. – designing of the study, coordination of the study, funding acquisition, writing – review & editing. All authors reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The study was supported by the National Science Centre (DEC- 2020/37/B/NZ7/00021).

Data availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

According to the Act on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes in Poland adopted on 15th January 2015 and according to earlier regulations (Act on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes in Poland adopted on 21st January 2005), the study described in this manuscript did not require the permission of the Local Ethical Commission for Investigations on Animals as all samples were collected during standard healthcare procedures implemented by a veterinarian for routine monitoring of the health status of the herd selected for the present study. Informed consent was obtained from the owner to use the animals in the study.

Consent for publication

Informed consent for publishing the results was obtained from the owner of animals.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 18 December 2023 / Accepted: 18 April 2024

Published online: 03 May 2024

References

- Turlewicz-Podbielska H, Włodarek J, Pomorska-Mól M. Noninvasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review. *J Vet Diagn.* 2020;32:503–12.
- Quesnel H, Farmer C, Devillers N. Colostrum intake: influence on piglet performance and factors of variation. *Livest Sci.* 2012;146:105–14.
- Maciag SS, Bellaver FV, Bombassaro G, Haach V, Morés MAZ, Baron LF, Coldebella A, Bastos AP. On the influence of the source of porcine colostrum in the development of early immune ontogeny in piglets. *Sci Rep.* 2022;12:15630.
- Prickett JR, Kim W, Simer R, Yoon KJ, Zimmerman J. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Health Prod.* 2008;16:86–91.
- Lopez W, Angulo J, Linhares D, Zimmerman J. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *J Swine Health Prod.* 2018;26:146–50.
- Augustyniak A, Czyżewska-Dors E, Pomorska-Mól M. Immune status of piglets during the first week of life: current knowledge, significance, and assessment. *Ann Anim Sci.* 2023;23:391–401.
- Trevisan G, Angulo J, Johnson C, Jensen M, Utrera V, Marostica T, Gauger P, Linhares DCL. Increasing the functionality of your processing fluid toolbox beyond PRRSV monitoring: PCV2, PEDV, and PDCoV. *Proceedings of the 51st Annual Meeting American Association of Swine Veterinarians*; 2020 Mar7-10; Atlanta, Georgia, USA. American Association of Swine Veterinarians (AAV); 2020;27–8.
- Magtoto R, Armenta-Leyva B, Dizon-Magtoto P, Cheng T-Y, Clavijo MJ, Johnson C, Lopez W, Baum D, Zimmerman J, Giménez-Lirola LG. Performance of a *Mycoplasma hyopneumoniae* serum ELISA for antibody detection in processing fluids. *J Swine Health Prod.* 2022;30:165–70.
- Vilalta C, Sanhueza J, Alvarez J, Murray D, Torremorell M, Corzo C, Morrison R. Use of processing fluids and serum samples to characterise porcine reproductive and respiratory syndrome virus dynamics in 3-day-old pigs. *Vet Microbiol.* 2018;225:149–56.
- Trevisan G, Jablonski E, Angulo J, Lopez WA, Linhares DCL. Use of processing fluid samples for longitudinal monitoring of PRRS virus in herds undergoing virus elimination. *Porc Health Manag.* 2019;5:18.
- Vilalta C, Sanhueza JM, Murray D, Johnson L, Pieters M. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglet processing fluids. *Vet Rec.* 2019;185:510.
- Klobasa F, Werhahn E, Butler JE. Composition of sow milk during lactation. *J Anim Sci.* 1987;64:1458–66.
- Markowska-Daniel I, Pomorska-Mól M. Shifts in immunoglobulins levels in the porcine mammary secretions during whole lactation period. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2010;54:345–9.
- Markowska-Daniel I, Pomorska-Mól M, Pejsak Z. Dynamic changes of immunoglobulin concentrations in pig colostrum and serum around parturition. *Pol J Vet Sci.* 2010;13:21–7.
- Czyżewska-Dors E, Wierzechowski K, Pomorska-Mól M. Serum Concentrations of Immunoglobulins and Cortisol around Parturition in clinically healthy sows and sows with Postpartum Dysgalactia Syndrome (PDS). *J Vet Res.* 2022;66:245–50.
- Bandrick M, Ariza-Niet C, Baidoo SK, Molitor TW. Colostral antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. *Dev Comp Immunol.* 2014;43:114–20.
- Devillers N, Farmer C, Mounier AM, Le Dividich J, Prunier A. Hormones. IgG and lactose, changes around parturition in plasma, and colostrum or saliva of multiparous sows. *Reprod Nutr Dev.* 2004;44:381–96.
- Frenyó VL, Pethes G, Antal T, Szabó I. Changes in colostral and serum IgG content in swine in relation to time. *Vet Res Commun.* 1981;4:275–82.
- Kielland C, Rootwelt V, Reksen O, Framstad T. The association between immunoglobulin G in sow colostrum and piglet plasma. *J Anim Sci.* 2015;93:4453–62.
- Nguyen TV, Yuan L, Azevedo MS, Jeon KI, Gonzalez AM, Saif LJ. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;117:236–48.
- Ogawa S, Tsukahara T, Nishibayashi R, Nakatani M, Okutani M, Nakanishi N, Ushida K, Inoue R. Shotgun proteomic analysis of porcine colostrum and mature milk. *Anim Sci J.* 2014;85:440–8.
- Llamas Moya S, Boyle LA, Lynch PB, Arkins S. Age-related changes in pro-inflammatory cytokines, acute phase proteins and cortisol concentrations in neonatal piglets. *Neonatology.* 2007;91:44–8.
- Padilla L, Barranco I, Parrilla I, Lucas X, Rodriguez-Martinez H, Roca J. Measurable cytokine concentrations in Pig seminal plasma are modified by Semen Handling and Storage. *Biology (Basel).* 2020;9:276.
- Ramírez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Audí C, Castell M, Moretones MG, López-Sabater MC, Castellote C, Franch A. Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human colostrum. *J Dairy Sci.* 2012;95:2319–25.
- Saco Y, Bassols A. Acute phase proteins in cattle and swine: a review. *Vet Clin Pathol.* 2023;52:50–63.
- Piñeiro M, Gymnich S, Knura S, Piñeiro C, Petersen B. Meat juice: an alternative matrix for assessing animal health by measuring acute phase proteins. Correlations of pig-MAP and haptoglobin concentrations in pig meat juice and plasma. *Res Vet Sci.* 2009;87:273–6.
- Martin M, Tesouro MA, González-Ramón N, Piñeiro A, Lampreave F. Major plasma proteins in pig serum during post-natal development. *Reprod Fertil Dev.* 2005;17:439–45.
- Hiss-Pesch S, Daniel F, Dunkelberg-Denk S, Mielenz M, Sauerwein H. Transfer of maternal haptoglobin to suckling piglets. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;144:104–10.
- Werner C, Schubert A, Schrödl W, Krüger M, Sundrum A. Effects of feeding different roughage components to sows in gestation on bacteriological and immunological parameters in colostrum. *Arch Anim Nutr.* 2014;68:29–41.
- Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004;35:163–87.
- Sánchez J, Fuentes N, Ibañez-López FJ, López-García I, Gutiérrez AM. A multi-herd study shows that saliva is more than a reflection of serum biomarkers in pigs. *Animal.* 2021;15:100413.
- Hennig-Pauka I, Menzel A, Boehme TR, Schierbaum H, Ganter M, Schulz J. Haptoglobin and C-Reactive protein-non-specific markers for nursery conditions in Swine. *Front Vet Sci.* 2019;6:92.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



OPEN Field study on the utility of fluid obtained from testicles as a sample for detecting antibodies to selected swine pathogens

Agata Augustyniak¹, Ewelina Czyżewska-Dors² & Małgorzata Pomorska-Mól^{1✉}

Processing fluid is a promising alternative to blood for monitoring porcine diseases, although certain aspects of its routine use remain unclear. This study evaluated serum from females and males, along with corresponding testicular only processing fluid, for antibodies against *Actionbacillus pleuropneumonie*, hepatitis E virus, porcine epidemic diarrhea virus, influenza A virus, *Erysipetothrix rhusiopathie* and *Mycoplasma hyopneumoniae*, using commercial ELISAs (ID Screen APP, Hepatitis E, PEDV, Influenza A from ID Vet, France; Civtest suis SE/MR from Hipra, Spain; and *Mycoplasma hyopneumoniae* from Idexx, USA). Differences in the proportion of positive results across sample types were analysed to assess the utility of testis-derived processing fluid for litter-level health monitoring. ROC analysis was used to establish optimal cut-offs for processing fluid, followed by evaluation of diagnostic performance using both manufacturer-recommended and ROC-derived thresholds. A pooling simulation was also performed. Results indicate that processing fluid collected exclusively from testes can detect antibodies against selected pathogens effectively. Some ELISA kits validated for serum may be applicable to processing fluid, provided that appropriate cut-off values are determined for this sample type. However, pooling processing fluid samples may reduce sensitivity and increase the risk of false-negative results. These findings highlight the potential of testis-derived processing fluid for large-scale serological surveillance while underscoring the need for test-specific validation.

Keywords Processing fluid, Antibodies, Detection, ELISA

Swine health is one of the most important factors influencing the performance of pig husbandry. The intensification of swine production during the last decades has increased the significance of multifactorial diseases^{1,2}. In addition, within the last few years, difficult-to-control porcine diseases, like African swine fever, have emerged or re-emerged³. This complicates herd health management since efficient control of such diseases is often challenging and requires a complex approach. Among the most important strategies of herd health management is farm biosecurity. It includes all efforts to minimise the pathogen introduction and spread within the farm³. Biosecurity involves many aspects of farm management, like quarantine and acclimatisation, as the arrival of new pigs creates the highest possibility of pathogen introduction³. During quarantine, pigs are usually tested for various pathogens or specific antibodies, increasing farm biosecurity. Implementing control or eradication programs is another strategy that increases the herd's health status; applying surveillance is crucial for monitoring its progress. Other approaches include, among others, the use of drugs and vaccines. Due to the associated costs, decisions regarding these interventions should be made with caution; laboratory analyses may support the decision-making process⁴. Consequently, porcine health management relies primarily on regular health status monitoring using direct or indirect laboratory diagnostic methods. One of the most commonly applied approaches is the analysis of specific antibodies against pathogens of interest to assess herd health status. For this purpose, ELISA tests are among the most widely used methods. They are highly cost-effective and allow for large-scale sample testing. ELISA assays are particularly valuable in naïve populations or when the disease status is unknown. In contrast to antibody detection, direct pathogen detection is often more challenging, as antibodies usually persist longer in the host than the pathogen itself. The window of opportunity for direct detection methods, such as PCR, is limited and depends on the stage of infection. ELISA facilitates broader epidemiological assessments by assessing the proportion of seropositive individuals or monitoring changes in

¹Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Poznan University of Life Sciences, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland. ²Department of Internal Diseases and Diagnostics, Poznan University of Life Sciences, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland. ✉email: mpomorska@up.poznan.pl

antibody levels over time. Numerous commercial ELISA kits are available to detect specific antibodies in porcine serum.

Processing fluid (PF) consists of blood and tissue fluid recovered from castration and tail docking, usually performed between 3 and 5 days of piglet life. These procedures are still routinely performed on many farms worldwide. Therefore, PF's collection does not require additional work and time and does not generate additional cost or stress for animals. Due to these reasons, PF has gained scientists' attention as a new, possible alternative to blood, the most common sample type for diagnosing and monitoring pigs' health status. The search for alternative sample types stems from challenges associated with blood collection and increasing emphasis on animal welfare. Blood collection is a labour- and time-intensive procedure that requires restraining the pigs, poses risks to both animals and personnel and negatively affects animal welfare^{5,6}. Examples of already described alternative matrices include oral fluid or meat juice (MJ), which proved useful for important porcine pathogens antibodies and/or genetic material detection. Regarding PF, many aspects of its potential diagnostic utility remain unknown. Numerous studies confirmed the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genetic material in the PF samples tested via PCR, and available data indicate its potential usefulness in improving the monitoring of this pathogen in breeding herds^{7,8}. The feasibility of using PF for direct diagnostics by PCR has also been confirmed for *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2^{9,10}. Except for the pathogens' genetic material, PF could also be used to assess the presence of piglets' immunological indices by ELISA assay, including antibodies, cytokines, and acute phase proteins, representing a promising alternative to blood in assessing piglets' immune status at processing age¹¹. Antibodies present in the blood of newborn piglets are of colostral origin, representing circulating maternal antibodies, and are not proof of piglets' infection or vaccination¹². Therefore, antibodies contained in the PF may provide insight into indirect sow herd surveillance¹². The data indicate that PF represents a sample that can be used to detect specific antibodies against various porcine pathogens^{8,10,13,14}. It is worth noting that in previous studies, ELISA kits validated for serum were used to detect antibodies in PF. Until commercial ELISA kits validated for new matrices, including PF, become available, it is necessary to use ELISA kits validated for serum when testing PF.

The present study aimed to evaluate the diagnostic utility of testicular-only processing fluid (tPF) for detecting antibodies against selected three bacterial and three viral porcine pathogens: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (*E. rhusiopathiae*), hepatitis E virus (HEV), porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV), influenza A virus (IAV), and *Mycoplasma hyopneumoniae*, using commercially available ELISA kits validated for serum samples. Previous studies assessing processing fluid or diagnostic purposes typically analysed mixed PF samples containing fluid from both testicles and tails. However, recent findings by Gomes-Neves et al. (2024) showed that only 22% of 15,683 weaners examined had docked tails¹⁵, reflecting a broader downward trend in tail docking, also observed in Poland. Therefore, this study focused specifically on evaluating the diagnostic performance of tPF. Additionally, results obtained from tPF were compared with those from serum samples collected from male and female piglets. Under field conditions, PF is typically tested as a pooled sample, with tissues from multiple litters combined in one container. However, pooling may affect diagnostic sensitivity by diluting target analytes, particularly in cases of low pathogen or antibody prevalence. Due to the limited data on this topic, the present study also investigated the effects of sample pooling and initial antibody levels on ELISA test outcomes.

Results
A. pleuropneumoniae

Using the cut-off recommended by the ELISA test manufacturer (S/P%>27%), 93 out of 178 (52.25%) tPF samples and 143 out of 178 (80.34%) corresponding male serum samples were classified as positive (Table 1). No significant differences have been found between the number of positive results obtained from the serum of males and females (p > 0.05; Table 1). The optimal cut-off for tPF samples has been established based on Receiver Operating Characteristic (ROC) curve results at S/P%>15%. Using this value, 122 out of 178 (68.54%) tPF samples were classified as positive (Table 1). However, the statistically significant difference in positive sample proportion between piglets' serum of both genders and tPF was observed, independently of the cut-off used (p < 0.05; Table 1). The descriptive statistics regarding the test's results are presented in Table 2. The AUC value determined for tPF (0.897) was significantly lower when compared to the reference and was classified as considerable (p < 0.05; Fig. 1). Implementing a new cut-off improves the test's sensitivity, NPV, and accuracy, although it slightly reduces specificity and PPV. It also increased the kappa coefficient (from 0.42 to 0.55); however, the agreement remained moderate. A detailed comparison of the selected test parameters and agreement measures depending on the implemented cut-off values is presented in Table 3.

Sample type	Positive/Total	Proportion of positive samples (%)	95%CI
Male piglets' serum	143/178	80.34 ^a	73.88–85.51
Female piglets' serum	132/159	83.02 ^a	76.42–88.06
tPF (manufacturer's cut-off)	93/178	52.25 ^b	44.94–59.46
tPF (optimal cut-off)	122/178	68.54 ^c	61.39–74.91

Table 1. The comparison of anti-A. Pleuropneumoniae antibody presence in different matrices. a,b,cDifferent letters represent a statistically significant difference between the analysed samples (p < 0.05); 95% CI – 95% confidence interval.

	Mean	Min.	Max	SD
Male piglets' serum S/P%	159.16	6.19	549.42	107.23
Female piglets' serum S/P%	159.73	10.34	370.49	95.52
tPF S/P%	53.60	3.10	284.12	51.02

Table 2. Mean ($\pm$ SD) and range (minimum and maximum) S/P% values obtained for *A. pleuropneumoniae* ELISA for various samples. Min. – minimum value; Max. – maximum value; SD – standard deviation.

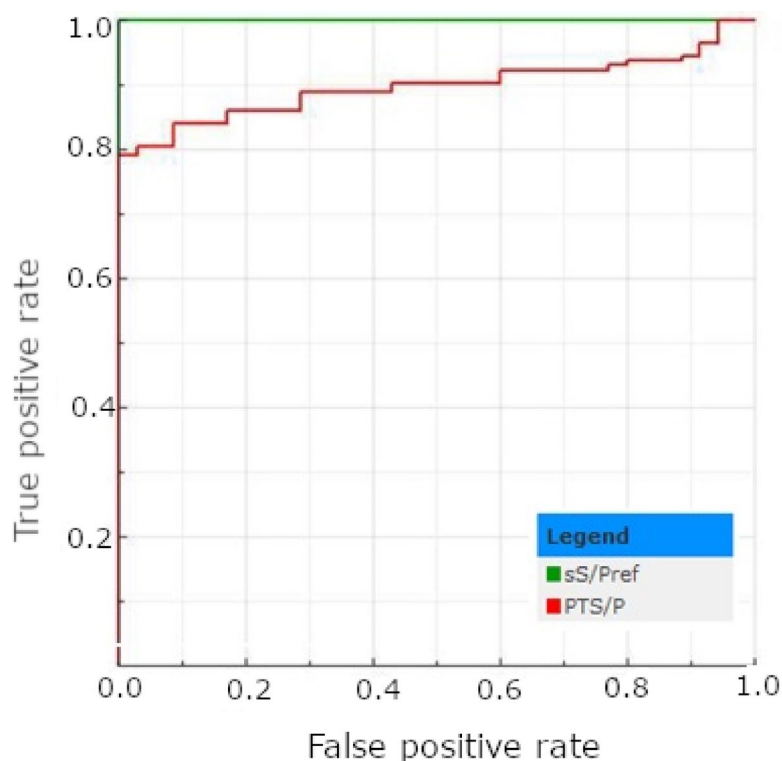


Fig. 1. The ROC plots determined for the *A. pleuropneumoniae* ELISA test results obtained for serum (sS/Pref) and tPF (PTS/P).

Cut-off (S/P%)	27	15
Sensitivity	0.65	0.82
Specificity	1	0.86
Positive predictive values	1	0.96
Negative predictive values	0.41	0.54
Accuracy	0.72	0.83
Kappa coefficient	0.42	0.55

Table 3. The comparison of the selected *A. pleuropneumoniae* test parameters and measures of agreement depending on the implemented cut-off values.

In the next step, tPF pools were tested to determine the maximum dilution to detect one positive sample in a pool of negatives. Using the cut-off value recommended by the manufacturer, anti-*A. pleuropneumoniae* antibodies were detected only in 1 out of three low-positive samples at dilutions of 1:10. Nevertheless, using the ROC-calculated cut-off, all samples at dilution up to 1:20 and two out of three at dilution 1:40 were classified as positive. In general, 8% (1/12) and 66% (8/12) of low-positive samples were correctly classified as positive after applying the manufacturer's and ROC-calculated cut-off, respectively. Using the manufacturer's cut-off, all moderate-positive samples were correctly classified at dilution 1:10, and one out of three samples at dilution 1:20. Using ROC-calculated cut-off, all moderate-positive samples were correctly classified at dilutions up to 1:40. In total, 33% (4/12) and 75% (9/12) of moderate-positive samples were correctly classified as positive

Sample type	Positive/Total	Proportion of positive samples (%)	95% CI
Male piglets serum	127/160	79.38 ^a	72.45–84.92
Female piglets serum	126/154	81.82 ^a	74.98–87.11
tPF (manufacturer's cut-off)	89/160	55.62 ^b	47.88–63.1
tPF (ROC's cut-off)	127/160	79.38 ^a	72.45–84.92

Table 4. The comparison of anti-*E. rhusiopathiae* antibody presence in different matrices. ^{a,b}Different letters represent a statistically significant difference between the analysed samples ($p < 0.05$); 95% CI – 95% confidence interval.

	Mean	Min.	Max.	SD
Male piglets' serum IRPC	82.58	-3.34	141.69	37.20
Female piglets' serum IRPC	85.67	-3.03	145.63	35.03
tPF IRPC	57.77	0.80	147.97	41.36

Table 5. Mean ($\pm$ SD) and range (minimum and maximum) IRPC values obtained for *E. rhusiopathiae* ELISA for various samples. Min. – minimum value; Max. – maximum value; SD – standard deviation.

after applying manufacturer's and ROC-calculated cut-off, respectively. Using the cut-off value recommended by the manufacturer regarding high-positive samples, antibodies were detected in all samples diluted 1:10 and in 1 out of three at dilutions 1:20. When the ROC-calculated cut-off was applied, all samples at dilution up to 1:40 and two out of three at dilution 1:80 were classified as positive. In general, 33% (4/12) and 92% (11/12) of high-positive samples were correctly classified as positive after applying the manufacturer's and ROC-calculated cut-off, respectively.

E. rhusiopathiae

Interpreting the results following the cut-off recommended by the ELISA kit manufacturer for serum (40 IRPC), 89 out of 160 (55.62%) tested tPF samples were classified as positive for *E. rhusiopathiae* antibodies (Table 4). Among the corresponding male serum samples, 127 (79.38%) gave positive results (Table 4). No significant differences have been found between the number of positive results obtained from the serum of males and females ($p > 0.05$; Table 4). When using the cut-off recommended for serum, the number of serum samples positive for *E. rhusiopathiae* antibodies was significantly higher in both genders than in the tPF results ($p < 0.05$). The ROC curve analyses determined an optimal tPF cut-off at 14.5 IRPC. According to the ROC-calculated cut-off, the number of positive tPF samples increased and showed no significant difference compared to the results of serum samples collected from piglets of either sex ($p > 0.05$; Table 4). The descriptive statistics regarding the test's results are presented in Table 5. The AUC value for tPF (0.920) was classified as excellent; however, it was significantly lower compared to the reference ($p < 0.05$; Fig. 2). Implementing an optimal cut-off improved the test's sensitivity, NPV, and accuracy but decreased its PPV and specificity (Table 6). The kappa coefficient increased slightly (from 0.49 to 0.54), maintaining moderate agreement (Table 6).

Using the cut-off recommended for serum, all low-positive pooled tPF samples, regardless of their dilution, were negative for anti-*E. rhusiopathiae* antibody. However, when the ROC-calculated cut-off was used, all low-positive samples at the dilution of 1:10 and one at the dilution of 1:20 were classified as positive. In total, 0% (0/12) and 33.3% (4/12) of low-positive samples were correctly classified as positive following the manufacturer's and ROC-calculated cut-off, respectively. Among medium-positive samples, only two were positive for specific antibodies, one at the dilution of 1:10 and one at the dilution of 1:20. Applying the ROC-calculated cut-off value, specific antibodies were detected in all samples at the dilution up to 1:20, and in one sample at the dilution of 1:40. In general, 16.7% (2/12), and 58.3% (7/12) of medium-positive samples were correctly classified using manufacturer's and ROC-calculated cut-off, respectively. Using the cut-off recommended for serum, specific antibodies were detected in all high-positive samples at the dilution of 1:10 and one sample at the dilution of 1:20. All samples, independently of their dilution, were classified positive when the ROC-calculated cut-off was used; 33.3% (4/12), and 100% (12/12) of high-positive pooled PF samples were correctly classified after using manufacturer's and ROC-calculated cut-off, respectively.

HEV

Applying the cut-off value recommended for serum samples (S/P%>65%), 109 out of 160 (68.12%) tPF samples were classified as positive (Table 7). From the corresponding male serum samples, 123 gave positive results (76.88%; Table 7). The number of positive results obtained from female serum was comparable to that of male serum ($p > 0.05$; Table 7). No statistically significant difference has been found between male serum and tPF ($p > 0.05$); however, a significant difference was observed between tPF and female serum ($p < 0.05$; Table 7). Using the ROC-calculated cut-off (S/P%>45%), the number of positive tPF samples for HEV antibodies increased from 109 to 126 (78.75%; Table 7) and was comparable to that of each sex piglet's serum ($p > 0.05$). The descriptive statistics regarding the test's results are presented in Table 8. The AUC calculated for tPF (0.947) was classified as excellent, although it was significantly lower than the reference ($p < 0.05$; Fig. 3). Applying the optimal cut-off

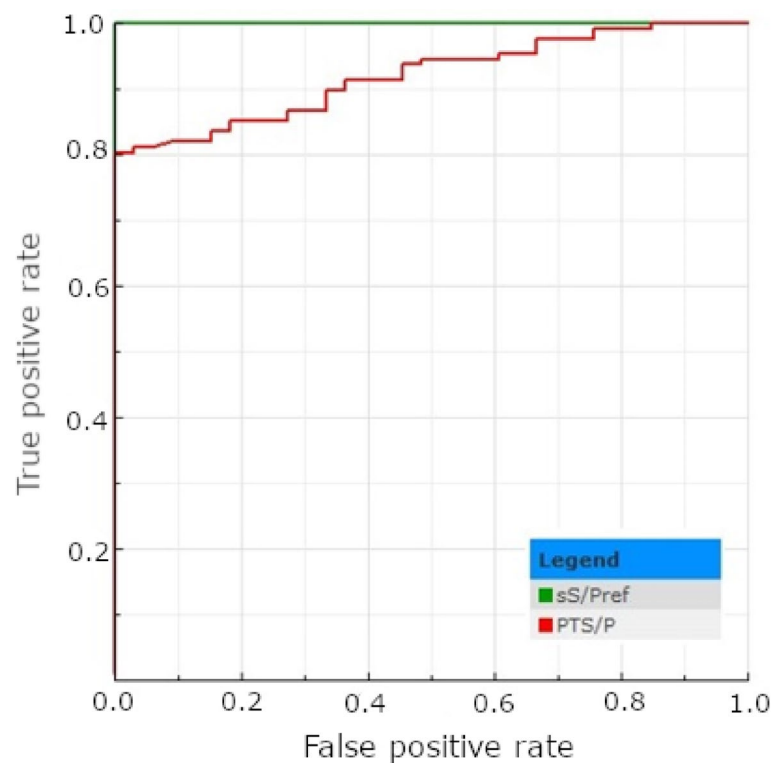


Fig. 2. The ROC plots determined for the *E. rhusiopathiae* ELISA test results obtained for serum (sS/Pref) and tPF (PTS/P).

Cut-off (IRPC)	40	14.5
Sensitivity	0.70	0.91
Specificity	1	0.64
Positive predictive values	1	0.91
Negative predictive values	0.46	0.64
Accuracy	0.76	0.85
Kappa coefficient	0.49	0.54

Table 6. The comparison of the selected *E. rhusiopathiae* test parameters and measures of agreement depending on the implemented cut-off values.

Sample type	Positive/Total	Proportion of positive samples (%)	95% CI
Male piglets serum	123/160	76.88 ^{a, b}	69.76–82.73
Female piglets serum	116/144	80.56 ^a	73.33–86.19
tPF (manufacturer’s cut-off)	109/160	68.12 ^b	60.55–74.85
tPF (ROC’s cut-off)	126/160	78.75 ^a	71.78–84.38

Table 7. The comparison of anti-HEV antibody presence in different matrices. ^{a, b}Different letters represent a statistically significant difference between the analysed samples ($p < 0.05$); 95% CI – 95% confidence interval.

value increased the test’s sensitivity, NPV, and slightly accuracy but decreased its specificity and PPV (Table 9). The kappa coefficient increased slightly, from 0.75 to 0.76, maintaining the substantial agreement (Table 9). Following the test manufacturer’s cut-off, all low-positive pooled tPF samples, independent of their dilution, were negative for anti-HEV antibodies. Applying the ROC-calculated cut-off, specific antibodies were detected in only one sample at the dilution of 1:10. Thus, none (0/12) and 8.33% (1/12) out of low-positive samples were correctly classified as positive when the test’s manufacturer and ROC-calculated cut-off values were applied, respectively. Similarly, using the cut-off recommended by the test’s manufacturer, all moderate-positive samples, independent of their dilution, were classified as negative. However, following the ROC-calculated cut-off,

	Mean	Min.	Max.	SD
Male piglets' serum S/P%	144.35	9.00	270.00	68.03
Female piglets' serum S/P%	144.54	-22.00	276.00	69.90
tPF S/P%	97.78	3.00	267.00	59.23

Table 8. Mean ($\pm$ SD) and range (minimum and maximum) S/P% values obtained for HEV ELISA for various samples. Min. – minimum value; Max. – maximum value; SD – standard deviation.

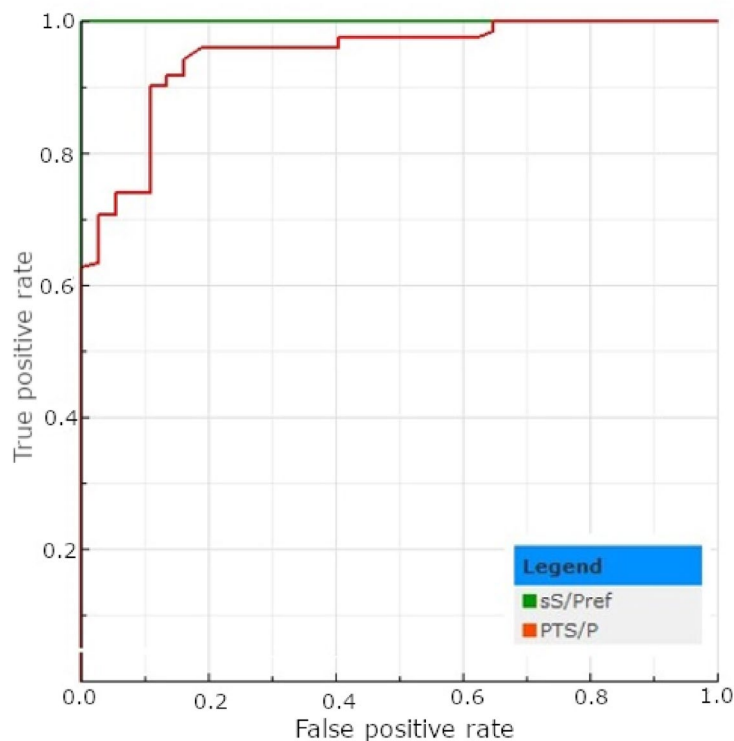


Fig. 3. The ROC plots determined for the HEV ELISA test results obtained for serum (sS/Pref) and tPF (PTS/P).

Cut-off (S/P%)	65	45
Sensitivity	0.88	0.96
Specificity	0.97	0.78
Positive predictive values	0.99	0.94
Negative predictive values	0.71	0.85
Accuracy	0.9	0.92
Kappa coefficient	0.75	0.76

Table 9. The comparison of the selected HEV test parameters and measures of agreement depending on the implemented cut-off values.

specific antibodies were detected in all samples at the dilution of 1:10 and one sample at the dilution of 1:20. In general, none (0/12) and 33% (4/12) of moderate-positive samples were correctly classified, after applying the test's manufacturer and ROC-calculated cut-off, respectively. According to the cut-off recommended by the test's manufacturer, specific antibodies were detected in three high-positive samples, two at the dilution of 1:10 and one at the dilution of 1:20. Using the ROC-calculated cut-off, all samples at the dilution up to 1:20, two samples at the dilution of 1:40, and one at the dilution of 1:80 were classified positive. In total, 25% (3/12) and 75% (9/12) of high-positive samples were classified as positive after implementing the test's manufacturer and ROC-calculated cut-off values, respectively.

Sample type	Positive/Total	Proportion of positive samples (%)	95% CI
Male piglets' serum	12/160	7.5%	4.34–12.65
Female piglets' serum	12/146	8.22%	4.76–13.82
tPF (manufacturer's cut-off)	5/160	3.12%	1.34–7.11
tPF (ROC's cut-off)	13/160	8.13%	4.81–13.4

Table 10. The comparison of anti-PEDV antibody presence in different matrices.

	Mean	Min.	Max.	SD
Male piglets' serum S/P%	17.94	1.00	114.00	24.01
Female piglets' serum S/P%	17.05	1.00	120.00	23.01
tPF S/P%	9.23	1.00	81.00	13.61

Table 11. Mean ($\pm$ SD) and range (minimum and maximum) S/P% values obtained for PEDV ELISA for various samples. Min. – minimum value; Max. – maximum value; SD – standard deviation.

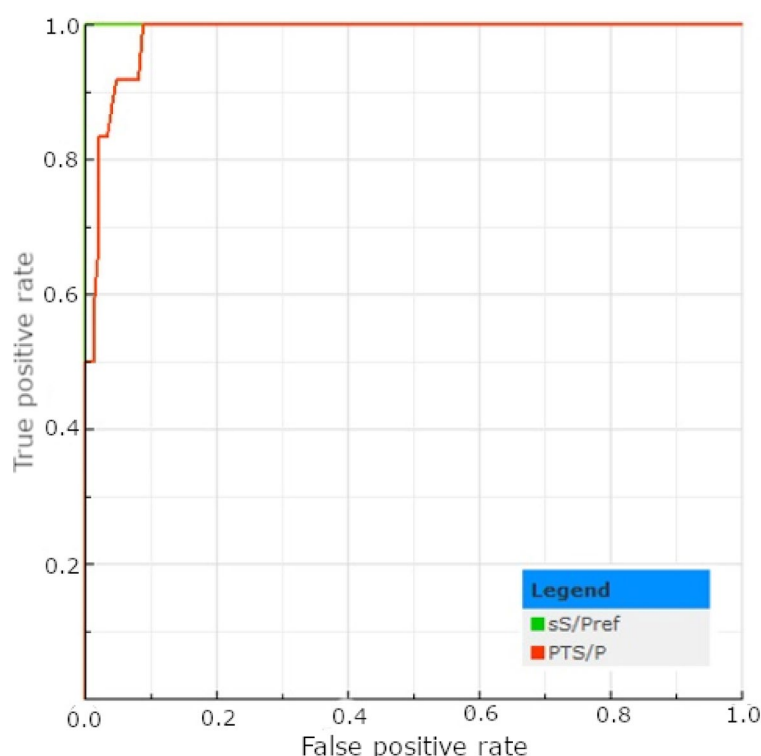


Fig. 4. The ROC plots determined for the PEDV ELISA test results obtained for serum (sS/Pref) and tPF (PTS/P).

PEDV

Following the cut-off recommended by the ELISA test's manufacturer ($S/P\% \geq 60\%$), 5 out of 160 tPF (3.12%) samples and 12 (7.5%) out of the corresponding male serum samples were positive (Table 10). The number of positive samples between each tested sample type was comparable ($p > 0.05$; Table 10). The ROC curve determined a new cut-off at $S/P\% > 24\%$, which increased the number of tPF-positive samples from 5 to 13 (8.13%; Table 10). The descriptive statistics regarding the test's results are presented in Table 11. There was no statistically significant difference between the referenced and tPF's (0.984) AUC ($p > 0.05$; Fig. 4), which was excellent. Applying the new cut-off increased the test's sensitivity, NPV, and accuracy while decreasing its specificity and PPV (Table 12). In addition, the increase in the kappa coefficient from 0.57 to 0.78 allows for reclassifying the agreement from moderate to substantial (Table 12).

Because of the low number of positive samples, categorisation regarding antibody presence was impossible; therefore, the influence of the dilution on antibody detection in the pooled tPF sample was not evaluated for PEDV.

Cut-off (S/P%)	60	24
Sensitivity	0.42	0.83
Specificity	1	0.97
Positive predictive values	1	0.77
Negative predictive values	0.95	0.99
Accuracy	0.96	0.97
Kappa coefficient	0.57	0.78

Table 12. The comparison of the selected PEDV test parameters and measures of agreement depending on the implemented cut-off values.

Sample type	Positive/Total	Proportion of positive samples (%)	95% CI
Male piglets serum	124/160	77.5% ^a	70.43–83.28
Female piglets serum	129/163	79.14% ^a	72.27–84.67
tPF (manufacturer’s cut-off)	82/160	51.25% ^b	43.57–58.87
tPF (ROC’s cut-off)	125/160	78.12% ^a	71.1–83.83

Table 13. The comparison of anti-IAV antibody presence in different matrices. ^{a,b}Different letters represent a statistically significant difference between the analysed samples ($p < 0.05$) 95% CI – 95% confidence interval.

	Mean	Min.	Max.	SD
Male piglets’ serum S/N%	29.65	2.97	106.59	32.71
Female piglets’ serum S/N%	27.64	3.06	105.14	31.14
tPF S/N%	49.47	3.66	104.86	31.88

Table 14. Mean ($\pm$ SD) and range (minimum and maximum) S/N% values obtained for IAV ELISA for various samples. Min. – minimum value; Max. – maximum value; SD – standard deviation.

IAV

Following the cut-off value recommended by the ELISA test manufacturer ($S/N\% < 47\%$), 82 out of 160 PF (51.25%) samples were classified as positive (Table 13). From the corresponding sera, 124 (77.5%) samples gave positive results (Table 13). The number of positive samples was comparable between male and female serum ($p > 0.05$; Table 13); however, the number of positive tPF was significantly lower than the positive number of each sex piglet’s sera ($p < 0.05$; Table 13). Using the ROC curve, an optimal cut-off value at 83 S/N% was determined for tPF and increased the number of tPF samples classified as positive to 125 (78.12%; Table 13), which was comparable to the results obtained from serum samples of each sex piglet ($p > 0.05$; Table 13). The descriptive statistics regarding the test’s results are presented in Table 14. There was no statistically significant difference between the references and tPF’s (0.996) AUC ($p > 0.05$; Fig. 5), which was excellent. Applying the ROC-calculated cut-off allowed for an increase in the test’s sensitivity, NPV, and accuracy. Meanwhile, the decrease in its specificity and PPV was only slight (Table 15). Implementing a new cut-off resulted in considerable growth of the kappa coefficient from 0.47 to 0.93, improving the agreement from moderate to great (Table 15).

Applying the test manufacturer’s cut-off value, all low-positive samples, regardless of their dilution, were classified as negative for the presence of anti-IAV antibodies. Respecting the ROC-calculated cut-off, two out of three low-positive samples at the dilution 1:10 were classified as positive. Hence, none (0/12) and 16.7% (2/12) of low-positive samples were correctly classified as positive, following the manufacturer’s and ROC-calculated cut-off, respectively. All moderate-positive samples, independent of dilution, were negative to the specific antibody when classified according to the test manufacturer’s cut-off. However, when the ROC-calculated cut-off was applied, all moderate-positive samples at the dilution of 1:10, two at the dilution of 1:20, and two at the dilution of 1:40 were classified as positive. None (0/12) and 58.3% (7/12) of moderate-positive samples were correctly classified as positive after using the test’s manufacturer or ROC-calculated cut-offs, respectively. Using the test’s manufacturer cut-off, specific antibodies were detected in all high-positive samples at the dilution of 1:10. Respecting the ROC-calculated cut-off value, all high-positive samples at the dilution of up to 1:40 and two at the dilution of 1:80 were classified as positive. In general, 25% (3/12) and 91.7% (11/12) of high-positive samples were correctly classified as positive after applying the manufacturer’s or ROC-calculated cut-off, respectively.

M. hyopneumoniae

Using the cut-off recommended for serum ($S/P > 0.35$), 105 out of 196 tPF (53.57%) samples and 154 (78.57%) out of the corresponding male serum samples were classified as positive (Table 16). The number of positive female piglet sera was comparable to that of positive male sera ($p > 0.05$; Table 16). The positive results from the tPF samples were significantly lower than those obtained from male and female sera ($p < 0.05$; Table 16).

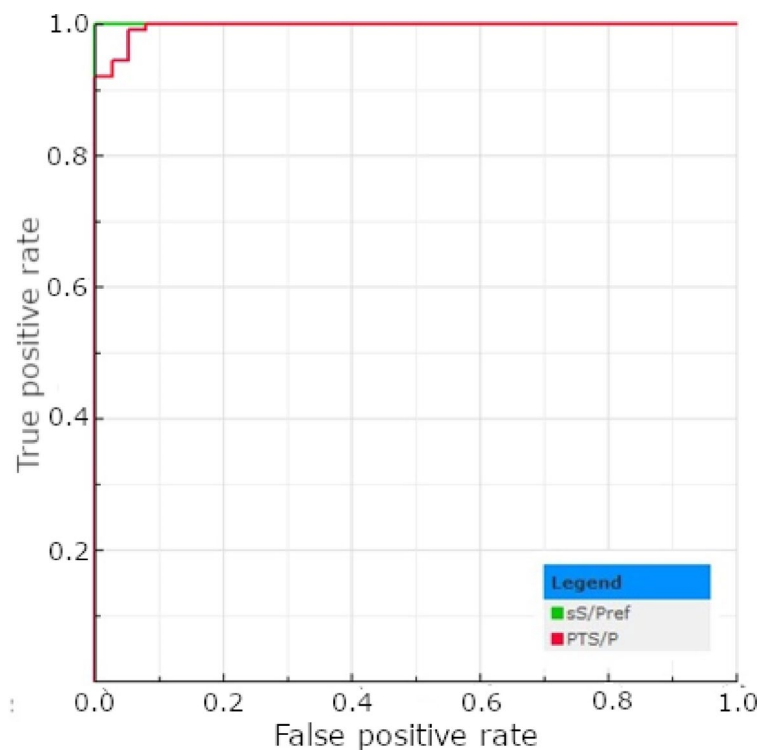


Fig. 5. The ROC plots determined for the IAV ELISA test results obtained for serum (sS/Pref) and tPF (PTS/P).

Cut-off (S/N%)	47	83
Sensitivity	0.66	0.99
Specificity	1	0.92
Positive predictive values	1	0.98
Negative predictive values	0.46	0.97
Accuracy	0.74	0.98
Kappa coefficient	0.47	0.93

Table 15. The comparison of the selected IAV test parameters and measures of agreement depending on the implemented cut-off values.

Sample type	Positive/Total	Proportion of positive samples (%)	95% CI
Male piglets serum	154/196	78.57% ^a	72.31–83.74
Female piglets serum	156/209	74.64% ^a	68.33–80.06
tPF (manufacturer's cut-off)	105/196	53.57% ^b	46.59–60.42
tPF (ROC's cut-off)	159/196	81.12% ^a	75.07–85.98

Table 16. The comparison of anti-*M. Hyopneumoniae* antibody presence in different matrices. ^{a,b}Different letters represent a statistically significant difference between the analysed samples ($p < 0.05$) 95% CI – 95% confidence interval.

Using the ROC-calculated cut-off ($S/P > 0.05$), the number of positive tPF samples increased to 159 (81.12%; Table 16), which was comparable to the positive sera number of piglets belonging to both genders ($p > 0.05$). The descriptive statistics regarding the test's results are presented in Table 17. The AUC determined for tPF (0.986) was significantly lower compared to the reference ($p < 0.05$; Fig. 6); however, it was classified as excellent. Implementing the new cut-off increased the values of almost all the test's parameters, except specificity, which was only slightly decreased, and the measure of agreement (kappa coefficient increased from 0.37 to 0.86), which was reclassified from fair to great (Table 18).

	Mean	Min.	Max.	SD
Male piglets' serum S/P	0.78	-0.05	1.91	0.49
Female piglets' serum S/P	0.77	-0.04	2.26	0.53
tPF S/P	0.40	-0.06	2.03	0.40

Table 17. Mean ($\pm$ SD) and range (minimum and maximum) S/P values obtained for *M. hyopneumoniae* ELISA for various samples. Min. – minimum value; Max. – maximum value; SD – standard deviation.

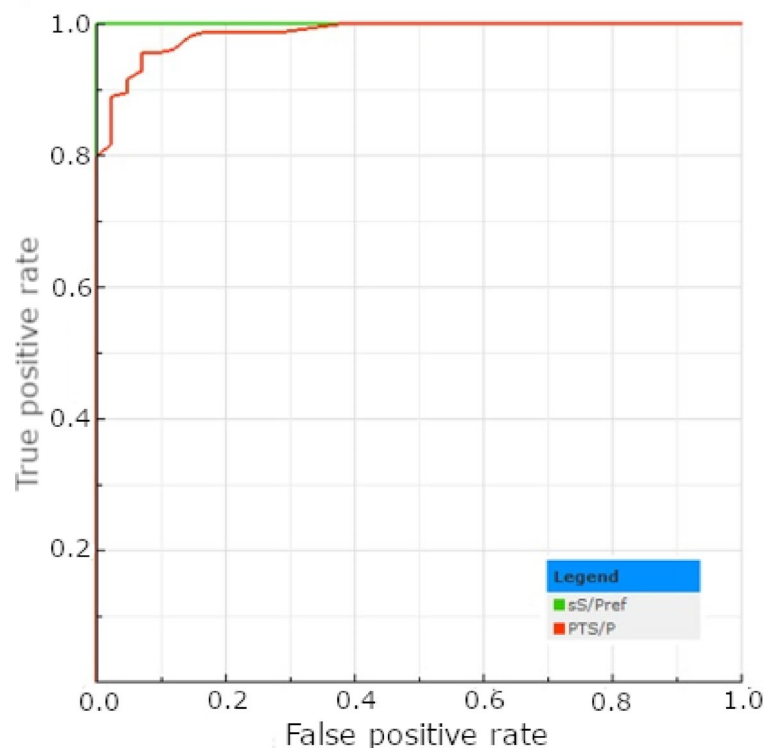


Fig. 6. The ROC plots determined for the *M. hyopneumoniae* ELISA test results obtained for serum (sS/Pref) and tPF (PTS/P).

Cut-off (S/P)	0.35	0.05
Sensitivity	0.65	0.99
Specificity	0.88	0.83
Positive predictive values	0.95	0.96
Negative predictive values	0.41	0.95
Accuracy	0.70	0.95
Kappa coefficient	0.37	0.86

Table 18. The comparison of the selected *M. hyopneumoniae* test parameters and measures of agreement depending on the implemented cut-off values.

Applying the cut-off value recommended by the test's manufacturer, all low-positive samples, regardless of the dilution, were negative for the anti-*M. hyopneumoniae* antibodies. When samples were classified using ROC-calculated cut-off, specific antibodies were detected in two out of three samples at the dilution of 1:10. Thus, none (0/12), and 16.7% (2/12) of low-positive samples were correctly classified as positive, after using the test's manufacturer and ROC-calculated cut-off. Using the manufacturer's cut-off, all moderate-positive samples were classified as negative. However, when applying the ROC-calculated cut-off, specific antibodies were detected in all samples at the dilutions up to 1:40. Thus, none (0/12) and 75% (9/12) of moderate-positive samples were correctly classified as positive following the test's manufacturer's ROC-calculated cut-off, respectively. Using the test's manufacturer's cut-off, specific antibodies were detected in all high-positive samples at the dilution

of 1:10; nevertheless, when applying an ROC-calculated cut-off, all high-positive samples were classified as positive. In total, 25% (3/12) and 100% (12/12) of high-positive samples were correctly classified following the test manufacturer's or ROC-calculated cut-offs, respectively.

Discussion

Despite being recognised for approximately 15 years as a promising diagnostic matrix for surveillance and disease monitoring in pigs, PF remains underexplored compared to other matrices. Consequently, there is a lack of commercially dedicated and validated diagnostic tests for PF. This scarcity necessitates using kits designed for other sample types, e.g., serum. Commercial ELISA kits are typically validated using serum samples collected from animals with well-defined health status, such as those clinically infected or known to be seronegative. Therefore, the cut-off values recommended by the manufacturers are usually specific to both the sample type and the disease context applied during test development. Applying these cut-offs to alternative matrices, such as PF or MJ, which may differ in composition and antibody concentration, may lead to suboptimal test performance. Much like MJ, PF contains both serum, lymph, and intracellular fluid, which can dilute the serum content¹⁶. Available data suggest that antibody concentration in other biological fluids, such as mentioned MJ, is lower than in serum¹⁶. However, the referenced study also shows a high agreement between ELISA results of serum and MJ samples when adequate dilutions were implemented and excellent sensitivity and specificity for MJ, which increased upon implementing different cut-offs¹⁶. As shown in the present study, several test parameters—such as sensitivity, NPV, and the kappa coefficient—were unsatisfactory when the manufacturer's cut-off values were used for tPF samples. However, calculating and implementing matrix-specific optimal cut-offs using ROC analysis considerably improved the performance of most evaluated ELISA kits. These findings underscore the importance of verifying and, if needed, recalibrating diagnostic thresholds when commercial ELISA kits are applied to sample types or testing conditions different from those for which they were initially designed.

The ideal diagnostic test should exhibit high values across all performance parameters; however, achieving this balance is often challenging. Sensitivity and specificity are measures of a diagnostic test's ability to correctly classify an animal as having or not having a disease. Sensitivity describes the ability to designate an animal with a disease as positive; if the diagnostic test is highly sensitive, it has few false-negative results, so fewer positive cases are missed. Specificity refers to the ability to identify an animal that does not have a disease as negative; if a test has high specificity, there are fewer false-positive results. It is ideal to use a test with high sensitivity and high specificity. Improving one parameter often leads to a decline in another. Depending on their purpose, diagnostic tests can be classified into discovery (screening), confirmatory, and exclusion tests¹⁷.

A good screening test should provide accurate results, so choosing tests with high sensitivity and specificity is reasonable. Positive results should be interpreted cautiously when a screening test is used in a generally healthy population. Confirmatory testing is often necessary to distinguish between true positive and false positive results obtained on initial screening^{18,19}. Understanding the predictive value when interpreting results obtained with a particular test in a specific population is important. PPV and NPV values depend on the sensitivity and specificity of the test being used and on the prevalence of the disease in the population. Predictive values can be regarded as 'reliable' results of individual tests. If the PPV is high, positive test results are generally accurate, whereas negative results may be questioned. If the disease is rare in the population, the positive predictive value will be low, regardless of the accuracy of the test. If there is a high NPV, negative test results are generally accurate, while positive results may be questioned^{18,20}. Determining and applying the optimal cut-off for tPF indicates the potential utility of some commercial ELISA tests for this sample.

For example, regarding the *M. hyopneumoniae* ELISA kit, implementing the optimal tPF's cut-off considerably improved almost all analysed performance parameters to near-perfect values, resulting in excellent accuracy and great agreement. The AUC value calculated for tPF, despite being significantly lower than for serum, was excellent, indicating collectively that the evaluated kit represents a useful tool for detecting specific antibodies in tPF.

A similar scenario was observed with the IAV kit. Implementing the ROC-calculated tPF cut-off improved previously unsatisfactory performance parameters, only slightly decreasing others, which gave excellent accuracy and great agreement. Alongside the comparable AUC for these matrices, this indicates the usefulness of the evaluated test for assessing the presence of specific antibodies in tPF after determining the optimal cut-off.

The PEDV kit displayed excellent accuracy regarding tPF even when respecting the cut-off recommended by the test's manufacturer; however, the proportion of anti-PEDV positive samples independent of the sample type was low, and it is known that diagnostic accuracy depends on prevalence²¹. The new cut-off considerably increased previously unsatisfactory sensitivity and the agreement, which was still acceptable despite being lower than in the case of the two above-described kits. These data, collectively with the comparable AUC values for tPF and the reference, indicate this kit's utility in detecting specific antibodies in tPF following the implementation of optimal cut-off.

Regarding the HEV ELISA kit, implementing the optimal tPF cut-off drove only a slight increase in the agreement, which did not change its classification and caused a considerable decrease in specificity, indicating the possibility of giving false positive results. Despite the AUC for tPF being significantly lower than the reference, it was classified as excellent, collectively with excellent sensitivity, accuracy, and acceptable remaining performance parameters, indicating this kit's possible utility in specific antibody detection in tPF following the new cut-off implementation.

Less promising results were obtained regarding the two remaining kits. The AUC value for tPF in the *E. rhusiopathiae* kit was classified as excellent despite being significantly lower than the reference. The optimal cut-off increased some of the analysed performance parameters of the *E. rhusiopathiae* kit, considerably decreasing specificity and indicating the risk of false-positive results. What is more, the increase in NPV was insufficient. Therefore, some performance parameters remained unsatisfactory despite the implementation of the optimal

cut-off for the tPF. Collectively, with a fair agreement, this questioned the kit's utility in assessing the presence of specific antibodies in tPF.

Although the optimal cut-off improved some of the *A. pleuropneumoniae* kit's parameters, the obtained sensitivity and NPV were the lowest among all kits evaluated in the present study. Moreover, it decreased specificity considerably and did not change the agreement classification, leaving it moderate only. Alongside the considerable AUC, this suggests the limited utility of this kit for detecting specific antibodies in tPF.

As mentioned previously, a decreasing trend in piglets' tail docking is observed in some countries¹⁵. In the European Union, the routine performance of this procedure is prohibited by the law restrictions²². Under such conditions, PF samples are collected from male piglets only. This may raise questions about the suitability of tPF for detecting specific indices in piglets of both genders. Thus, in the present study, the utility of PF obtained exclusively from testicles for detecting the presence of specific antibodies in male and female piglets was assessed. For this purpose, the differences in the proportion of positive samples between the serum of male piglets, female piglets, and tPF were determined. The present results indicate that the frequency of detected antibodies in tPF can be extrapolated to females. Thus, tPF can serve as an alternative sample to the serum of piglets belonging to both genders for detecting antibodies against major pig pathogens circulating in the herd.

However, this utility depends mainly on the ELISA kit used and the applied cut-off. For example, concerning the PEDV ELISA kit, there was no statistically significant difference in the proportion of positive samples among all tested matrices, regardless of the applied cut-off. In the case of the HEV ELISA kit, significant differences in the number of positive samples were observed between the serum of female piglets and tPF only; however, after implementing the ROC-calculated cut-off for tPF, these values were comparable.

On the other hand, regarding the *M. hyopneumoniae*, *E. rhusiopathiae*, and IAV ELISA kits, such differences were demonstrated between the serum of piglets belonging to both genders and tPF classified according to the test manufacturer's cut-off. When the ROC-calculated cut-off was used, these differences disappeared. It highlights the utility of tPF for specific antibody detection when using the optimal cut-off for tPF. However, regarding the APP ELISA kit, establishing and applying the optimal tPF cut-off did not eliminate the differences in the number of positive samples between piglets' serum and tPF, thereby limiting the utility of tPF for this ELISA kit.

Existing literature on the topic addressed in this study is scarce. One of the studies highlighted the potential utility of a commercial ELISA kit for monitoring anti-*M. hyopneumoniae* antibodies in breeding herds¹². The test used in the abovementioned study demonstrated excellent diagnostic sensitivity and specificity, at 97.6% and 100%, respectively; additionally, implementing an optimal cut-off for PF increased the first of the parameters¹². Another study demonstrated the suitability of a commercial ELISA kit, with slight procedural modifications, for detecting specific anti-PRRSV IgG in PF. Depending on the cut-off value applied, the kit achieved up to 99.0% sensitivity and 100% specificity⁸. The study's authors considered PF a cost-saving material for PRRSV monitoring in the negative or naïve breeding herds⁸. In both studies, lower dilutions of PF were used than those recommended for serum, and the tested PF represented pooled samples^{8,12}. In addition, in the study by Lopez et al. (2022), selected test components, like conjugate or incubation time, were modified, which could influence the obtained results⁸. Such an approach generates additional work and costs. Herein, our results provide the data regarding the utility of commercial ELISA kits to detect the presence of specific antibodies in tPF without any modification in the test procedure and the usefulness of individual tPF sample testing. In the study conducted by Di Bartolo et al. that aimed to assess individual PF samples' utility for specific anti-HEV antibody detection, respecting the cut-off recommended for serum samples, next to the good specificity (89%), the unsatisfying sensitivity (0.47) and slight agreement (0.19) were observed¹⁴. Applying the cut-off determined by ROC analysis results in 77% sensitivity and 56% specificity, with an increase in agreement to a fair level (0.27). Interestingly, the sensitivity and specificity were 88% and 67% at the litter level, respectively, and the agreement was moderated¹⁴.

Most available studies evaluating PF utility used aggregate PF samples rather than individual PF. Under field conditions, pooled sample testing can sometimes be more favourable than testing individual samples, such as in pathogen surveillance. However, pooling can affect the test results by diluting the sample. The obtained data emphasise the importance of calculating and applying an optimal cut-off for matrices other than those evaluated. Applying the ROC-calculated cut-off considerably increased the number of correctly classified pooled samples regarding each test. The present results showed, however, that pooling can influence the obtained results. The maximum dilution in which the samples were correctly classified depended on the sample positivity level. Regarding high-positive samples, 4 out of 5 evaluated ELISA kits correctly classified 100% of positive samples of the dilution up to 1:40, and 2 of them correctly classified all positive samples in each evaluated dilution when the ROC-calculated cut-off was applied. Among moderate-positive samples, only 2 ELISA kits correctly classified all samples in the dilution up to 1:40, when the ROC-calculated cut-off was applied. In the case of low-positive samples, 3 out of the evaluated ELISA kits failed to distinguish all positive samples at the dilution of 1:10. However, one ELISA kit correctly classified all samples in the dilution up to 1:20, and one sample in the dilution of 1:40, using the ROC-calculated cut-off. Using the tests' manufacturers' cut-offs, most tests did not correctly classify any low-positive and/or moderate-positive samples, regardless of the dilution. Our results align with the findings of the study by Di Bartolo et al. (2020), who also evaluated the effect of dilution on different PF samples' positivity levels¹⁴. Strong, medium, medium-weak, and weak ELISA samples diluted to 1:4, 1:5, 1:6, and 1:7 were tested with the commercial ELISA kit dedicated to serum. Using the ROC-calculated cut-off, samples of all levels, independent of dilution, were correctly classified. When applying the cut-off recommended by the test's manufacturer, only strong positive samples at all dilutions were correctly classified. Meanwhile, the test failed to classify weak samples correctly¹⁴.

In summary, the results of the current study suggest that specific commercially available ELISA kits, initially designed for detecting specific antibodies in serum, can also be used to identify these antibodies in tPF, provided that the optimal cut-off is applied. However, this highly depends on the specific ELISA kit used; thus, individual

analysis is necessary to determine the optimal cut-off value for each sample type. Additionally, each test's performance parameters and measures of agreement should be assessed. The test's parameters and agreement measures remained unsatisfactory for some kits, even when the optimal tPF cut-off was applied. These tests may require procedural modifications before being used for tPF analysis. When tPF was tested as a pooled sample, applying the modified cut-off provided significantly better discrimination of positive samples than the serum-specific cut-off. However, some samples, particularly those with high dilution, were still misclassified. The lack of significant differences between the number of positive samples detected in male and female serum and between the serum of both sexes and tPF indicates the potential utility of tPF for assessing the presence of specific antibodies in whole litters.

Methods
Samples

Samples used in the present study were collected from 6 commercial herds across Poland, though accurate health status data were not available for most of them. The samples were collected by veterinarians for various diagnostic purposes. tPF was obtained from testes removed by veterinarians during routine castrations of boars, which were carried out as part of standard animal husbandry practices in these herds. Consequently, no additional experimental procedures were implemented for animal sample collection. Blood was taken from males and females from the vena cava cranialis into clot activator tubes. tPF was recovered from testicles collected into falcon tubes during boar castration. All samples were transported to a laboratory in cooling conditions. Blood was centrifuged at 2500 × g for 15 min at 4 °C. Subsequently, all obtained serum samples were kept at -70 °C until analyses.

Laboratory analyses

Applying commercially available ELISA kits validated for serum, collected samples were evaluated for the presence of antibodies against six pathogens: A. pleuropneumoniae (ID Screen APP Screening Indirect (serotypes 1 through 12), ID vet, Grables, France), E. rhusiopathiae (Civtest suis SE/MR, Hipra, Amer, Spain), HEV (ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species, ID vet, Grables, France), PEDV (ID Screen PEDV Indirect; ID vet, Grables, France), IAV (ID Screen Influenza A Antibody Competition Multi-Species; ID vet, Grables, France), and M. hyopneumoniae (Mycoplasma hyopneumoniae Antibody Test Kit, Idexx, Westbrook, USA). The number of samples subjected to each analysis is presented in Table 19. Each test was performed, and the results were expressed according to the manufacturer's recommendations. The optical density (OD) was measured via Magellan v.7.2 software (Tecan), and the results were calculated according to the formulas recommended by the manufacturers of the kits. For A. pleuropneumoniae and PEDV kits, OD values were transformed to sample to positive (S/P) ratio calculated upon the following formula: S/P% = (sample's OD - negative control's OD)/(positive control's OD - negative control's OD) × 100. For the M. hyopneumoniae kit, OD values were transformed to S/P ratio according to this formula: S/P = (sample's OD - negative control's OD)/(positive control's OD - negative control's OD). For the E. rhusiopathiae kit, the OD values were transformed to IRPC (Relative Index × 100), calculated as follows: IRPC = (sample's OD - negative control's OD)/(positive control's OD-negative control's OD) × 10. The HEV kit was a bi-well test, meaning each sample and control must be deposited in duplicate. For each sample, a ned OD value had to be determined by calculating the difference between even wells' OD and odd wells' OD. Subsequently, the results were transformed to S/P% upon the following formula: S/P% = sample's ned OD/positive control's net OD × 100. For the IAV kit, OD values were transformed to a sample-to-negative (S/N) ratio calculated as follows: S/N% = sample's OD/negative control's OD × 100.

To assess the impact of pooling on the test results, the samples were categorised as low, moderate, and high-positives, according to the ranges presented in Table 20. The ranges provided are based on the distribution of results observed in this study and should be interpreted with caution, as they may not precisely reflect the antibody concentrations in individual samples.

Three positive samples were randomly selected for each range. Subsequently, for the pooling simulation, 10 µl of tPF from each range (low, moderate, and high-positive) were combined with appropriate volumes of negative tPF sample to mimic pools of 10, 20, 40, and 80 samples, each containing 1 positive sample and 9, 19, 39, and 79 negative samples, respectively. In total, 9 samples for each ELISA kit were assessed in four dilutions. The pooled samples were then tested according to the kit's instructions.

Statistical analyses

In the present study, the results of serum sample analysis represent a reference method. A commercial software package was used to calculate the proportion of positive samples for each tested matrix type (Statistica 13.3,

Assay direction	Male piglets serum	Female piglets serum	tPF	Total
A. pleuropneumoniae	178	159	178	515
E. rhusiopathiae	160	154	160	474
M. hyopneumoniae	196	209	196	601
IAV	160	163	160	483
HEV	160	144	160	464
PEDV	160	146	160	466

Table 19. The number of samples subjected to each laboratory analysis.

Assay direction	Ranges	Low-positive	Moderate-positive	High-positive
<i>A. pleuropneumoniae</i>	S/P%	≤ 70	> 70 ≤ 180	> 180
<i>E. rhusiopathiae</i>	IRPC	≤ 60	> 60 ≤ 100	> 100
<i>M. hyopneumoniae</i>	S/P	≥ 1.0	< 1.0 ≥ 0.5	< 0.5
IAV	S/N%	≥ 40	< 40 ≥ 15	< 15
HEV	S/P%	< 100	≥ 100 < 150	≥ 150
PEDV	S/P%	Not performed		

Table 20. The classification ranges used for grouping samples as low-, intermediate-, or high-positive.

TIBCO). The Wilson score method was used to calculate 95% confidence intervals. Differences in the proportion of antibody presence between the tested matrices were assessed using a chi-square test. The StAR software was used to generate and analyse the ROC curves to calculate the optimal tPF cut-offs and compare the area under the curve (AUC) for tPF and serum. Obtained AUC values were classified as follows: $0.9 \leq \text{AUC}$ – excellent; $0.8 \leq \text{AUC} < 0.9$ – considerable; $0.7 \leq \text{AUC} < 0.8$ – fair; $0.6 \leq \text{AUC} < 0.7$ – poor; $0.5 \leq \text{AUC} < 0.6$ – fail²³. The tests’ performance parameters, including sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy, were calculated for both, recommended by the tests’ manufacturers and ROC-calculated cut-offs. The agreement between the results obtained from serum samples and tPF was assessed with the kappa coefficient and was evaluated according to the following classification: < 0.2 – poor; $0.2\text{--}0.4$ – fair; $0.41\text{--}0.6$ – moderate; $0.61\text{--}0.8$ – substantial; > 0.8 – great²⁴. For all tests, the p-value was considered significant at < 0.05 .

Ethics declarations: According to the Act on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes in Poland adopted on 15th January 2015 and according to earlier regulations (Act on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes in Poland adopted on 21st January 2005), the study described in this manuscript did not require the permission of the Local Ethical Commission for Investigations on Animals as all samples were collected during standard healthcare procedures implemented by veterinarians caring for the herds to routinely monitor the health status of the herds selected for this study (i.e. serological profiles). The testicular-only processing fluid was obtained from the testis removed during routine boar castrations implemented in those herds. Thus, no extra experimental procedures were applied to collect samples from animals. Informed consent was obtained from the owner to use the animals in the study. All methods were carried out by relevant guidelines and regulations. All methods are reported in accordance with ARRIVE guidelines.

Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 17 December 2024; Accepted: 2 June 2025
Published online: 01 July 2025

References

1. Niewold, T. A., van Essen, G. J., Nabuurs, M. J., Stockhofe-Zurwieden, N. & van der Meulen J. A review of porcine pathophysiology: A different approach to disease. *Vet. Q.* **22**, 209–212 (2000).
2. Maes, D. G. D., Dewulf, J., Piñeiro, C., Edwards, S. & Kyriazakis, I. A critical reflection on intensive pork production with an emphasis on animal health and welfare. *J. Anim. Sci.* **98**(Suppl 1), S15–S26 (2020).
3. Alarcón, L. V., Allepuz, A. & Mateu, E. Biosecurity in pig farms: A review. *Porcine Health Manag.* <https://doi.org/10.1186/s40813-021-00202-5> (2021).
4. Friendship, R. Surveillance and decision-making in swine health management. In *Production Diseases in Farm Animals* (ed. Gross, J. J.) 587–598 (Springer, 2024).
5. Merlot, E., Mounier, A. M. & Prunier, A. Endocrine response of gilts to various common stressors: A comparison of indicators and analysis methods. *Physiol. Behav.* **102**, 259–265 (2011).
6. Roozen, A. W., Tsuma, V. T. & Magnusson, U. Effects of short-term restraint stress on plasma concentrations of catecholamines, beta-endorphin, and cortisol in gilts. *Am. J. Vet. Res.* **56**, 1225–1227 (1995).
7. Lopez, W., Angulo, J., Zimmerman, J. & Linhares, D. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *J. Swine Health Prod.* **26**, 146–150 (2018).
8. López, W. et al. Considerations in the use of processing fluids for the detection of PRRSV RNA and antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* **34**, 859–863 (2022).
9. Vilalta, C., Sanhueza, J. M., Murray, D., Johnson, L. & Pieters, M. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglet processing fluids. *Vet. Rec.* **85**, 510. <https://doi.org/10.1136/vr.105475> (2019).
10. Fan, M. et al. Infection characteristics of Porcine circovirus type 2 in different herds from intensive farms in china, 2022. *Front. Vet. Sci.* **10**, 1187753. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1187753> (2023).
11. Augustyniak, A., Czyżewska-Dors, E. & Pomorska-Mól, M. Concentrations of selected immunological parameters in the serum and processing fluid of suckling piglets and the serum and colostrum of their mothers. *BMC Vet. Res.* **20**, 170. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04024-9> (2024).
12. Magtoto, R. et al. Performance of a *Mycoplasma hyopneumoniae* serum ELISA for antibody detection in processing fluids. *J. Swine Health Prod.* **30**, 165–170 (2022).
13. Boettcher, J. et al. Testicles of castrated piglets an anachronism-but a powerful sample for disease surveillance in sow herds. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada—July 18–21, 2010* (2010).
14. Di Bartolo, I. et al. Pilot investigation on the presence of Anti-Hepatitis E virus (HEV) antibodies in piglet processing fluids. *Animals* **10**, 1168. <https://doi.org/10.3390/ani10071168> (2020).

15. Gomes-Neves, E., Teixeira, M. F. & Cardoso, M. F. Occurrence of tail Docking and tail biting in weaner pigs—A preliminary study in Portuguese abattoirs. *Livest. Sci.* **287**, 105533. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105533> (2024).
16. Nielsen, B., Ekeröth, L., Bager, F. & Lind, P. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of Salmonella infection in slaughter pig herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* **10**, 158–163 (1998).
17. Feinstein, A. R. XXXI. On the sensitivity, specificity, and discrimination of diagnostic tests. *Clin. Pharmacol. Ther.* **17**, 104–116 (1975).
18. Zeman, D. H. The best diagnostic test. *J. Swine Health Prod.* **5**, 159–160 (1997).
19. Maxim, L. D., Niebo, R. & Utell, M. J. Screening tests: A review with examples. *Inhal. Toxicol.* **31**, 298. <https://doi.org/10.1080/08958378.2019.1674481> (2019).
20. Monaghan, T. F. et al. Foundational statistical principles in medical research: Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value. *Medicina* **57**, 503. <https://doi.org/10.3390/medicina57050503> (2021).
21. Faizi, N. & Alvi, Y. Validity. In *Biostatistics Manual for Health Research: A Practical Guide to Data Analysis* (eds Faizi, N. & Alvi, Y.) 149–169 (Elsevier, 2023).
22. Commission Recommendation (EU) 2016/336 of 8 March 2016 on the application of Council Directive 2008/120/EC laying down minimum standards for the protection of pigs as regards measures to reduce the need for tail-docking. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32016H0336>.
23. Çorbacıoğlu, Ş. K. & Aksel, G. Receiver operating characteristic curve analysis in diagnostic accuracy studies: A guide to interpreting the area under the curve value. *Turk. J. Emerg. Med.* **23**, 195–198 (2023).
24. Landis, J. R. & Koch, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**, 159–174 (1977).

Acknowledgements

The study was supported by the National Science Centre (DEC- 2020/37/B/NZ7/00021).

Author contributions

A.A.—designing of the study, research on available knowledge about the topic, sample collection, laboratory analyses, interpretation of data, writing—original draft, writing - review & editing. E.C.D.—research on available knowledge about the topic, sample collection, interpretation of data, writing—review & editing. M.P.M.—designing of the study, coordination of the study, funding acquisition, writing—review & editing. All authors reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.P.-M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2025