

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

lek. wet. Hanna Turlewicz-Podbielska

**Przydatność płynu technologicznego pozyskanego wyłącznie
z jąder w diagnostyce wybranych zakażeń wirusowych u świń**

*The usefulness of testicular-only processing fluid in the diagnostics of selected
viral infections in pigs*

Praca doktorska

Doctoral thesis

Dziedzina: **nauki weterynaryjne**

Dyscyplina: **weterynaria**

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

Promotor pomocniczy: **dr n. wet. Arkadiusz Dors**

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

Poznań, 11.05.2026

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

Wykaz artykułów wchodzących w skład cyklu:

Wstęp:

1. Turlewicz-Podbielska H., Włodarek J., Pomorska-Mól M. Noninvasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2020, 32(4):503-512.

MNiSW₂₀₂₀: **100**; IF₂₀₂₀: **1.13**; IF-5: **1.5**; Kwartył: **Q2**

Część badawcza:

1. Turlewicz-Podbielska H., Dors A., Pomorska-Mól M. Evaluation of the utility of testicular-only processing fluid for PRRSV diagnostics and the effect of sample pooling on the test results. *Journal of Veterinary Research*, 2025, 69(1):7-16.

MNiSW₂₀₂₅: **140**; IF₂₀₂₅: **1.5**; IF-5: **1.9**; Kwartył: **Q2**

2. Turlewicz-Podbielska H., Dors A., Pomorska-Mól M: Testicular processing fluid as a useful matrix for the detection of porcine circovirus type 2 DNA and virus-specific antibodies. *Frontiers in Veterinary Science*, 2026, 13:1745725.

MNiSW₂₀₂₆: **70**; IF₂₀₂₆: **2.9**; IF-5: **3.3**; Kwartył: **Q1**

Łączny Impact Factor – 5.53 (w tym prace oryginalne 4.4)

Suma punktów MNiSW – 310 (w tym prace oryginalne 210)

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM nr 2020/37/N/NZ7/00084 pt. *Płyn zabiegowy: Nowa matryca w diagnostyce laboratoryjnej oraz badaniach podstawowych.*

Kierownik projektu: lek. wet. Hanna Turlewicz-Podbielska

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

*Pragnę serdecznie podziękować Pani Promotor, **prof. dr hab. Małgorzacie Pomorskiej-Mól**, za cenne wskazówki, opiekę naukową oraz wsparcie merytoryczne w trakcie realizacji niniejszej pracy.*

*Dziękuję również Promotorowi Pomocniczemu, **dr. n. wet. Arkadiuszowi Dorsowi**, za zaangażowanie oraz pomoc w rozwiązywaniu napotykanym trudności badawczych.*

*Na końcu, lecz z największą wdzięcznością, dziękuję mojemu Mężowi, **Konstantemu Podbielskiemu**, za cierpliwość, wyrozumiałość i wsparcie, bez których powstanie tej pracy nie byłoby możliwe.*

*Szczególne podziękowania kieruję również do **Stasia**, który nie zawsze sprzyjał spokojnej pracy, ale zawsze przypominał o tym, co najważniejsze.*

Spis treści

1. Streszczenie	5
2. Abstract	7
3. Wykaz skrótów	8
4. Wstęp	11
4.1 PRRSV i znaczenie jego wczesnego wykrywania	11
4.2 PCV2 i znaczenie jego wczesnego wykrywania	13
4.3 Diagnostyka laboratoryjna w monitorowaniu zakażeń PRRSV i PCV2	15
4.4 Płyn technologiczny	18
4.5 Zastosowanie PF w diagnostyce i monitoringu PRRSV	19
4.6 Zastosowanie PF w wykrywaniu i monitoringu PCV2	21
4.7 Znaczenie próbek zbiorczych	22
5. Hipoteza i cele badań	24
5.1 Hipoteza	24
5.2 Cel pracy	25
6. Materiały i metody	26
6.1 Próbki	26
6.2 Wykrywanie przeciwciał przeciwko PRRSV i symulacja pulowania	27
6.3 Wykrywanie przeciwciał przeciwko PCV2 i symulacja pulowania	30
6.4 Wykrywanie materiału genetycznego PRRSV i symulacja pulowania	32
6.5 Wykrywanie materiału genetycznego PCV2 i symulacja pulowania	34
6.6 Analiza statystyczna	36
7. Wyniki	38
7.1 Wykrywanie przeciwciał przeciwko PRRSV i symulacja pulowania	38
7.2 Wykrywanie przeciwciał przeciwko PCV2 i symulacja pulowania	41
7.3 Wykrywanie materiału genetycznego PRRSV i symulacja pulowania	43
7.4 Wykrywanie materiału genetycznego PCV2 i symulacja pulowania	45
8. Dyskusja	48
9. Podsumowanie	62
10. Wnioski	64
11. Bibliografia	65
12. Spis rycin i tabel	80
12.1 Spis rycin	80
12.2 Spis tabel	80
13. Oświadczenia współautorów publikacji	82
14. Artykuły wchodzące w skład cyklu	88

1. Streszczenie

Monitorowanie zakażeń wirusowych w stadach świń jest kluczowe dla zarządzania zdrowiem zwierząt. Rutynowo stosowaną próbką diagnostyczną jest surowica, jednak jej pobieranie wiąże się z ograniczeniami logistycznymi, ekonomicznymi i dobrostanowymi, co uzasadnia poszukiwanie alternatywnych materiałów diagnostycznych, takich jak płyn technologiczny pozyskiwany wyłącznie z jąder (ang. *testicular-only processing fluid*, TOPF). W niniejszej pracy oceniono przydatność TOPF w diagnostyce zakażeń wirusem zespołu rozrodczo-oddechowego świń (ang. *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV) oraz cirkowirusem świń typu 2 (ang. *porcine circovirus type 2*, PCV2) z wykorzystaniem komercyjnych testów immunoenzymatycznych (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) oraz ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją/ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction/quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR/qPCR) dedykowanych do innych rodzajów próbek, analizując próbki TOPF oraz odpowiadające im próbki surowicy. Dodatkowo oceniono wpływ pulowania próbek na uzyskane wyniki oraz możliwość wykorzystania tej próbki do oceny statusu zdrowotnego całych miotów.

W próbkach TOPF potwierdzono obecność przeciwciał oraz materiału genetycznego PRRSV i PCV2. Wykazano, że TOPF może stanowić użyteczną matrycę dla testów ELISA jednak wymaga to odpowiedniej modyfikacji punktów odcięcia. W badaniach molekularnych dla PRRSV wykazano umiarkowaną czułość metody i ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych, przy jednoczesnej wysokiej wiarygodności wyników dodatnich po zastosowaniu optymalnego punktu odcięcia. W przypadku PCV2 zastosowanie TOPF w teście qPCR wykazało wysoką czułość i swoistość oraz bardzo dobrą zgodność z surowicą, jednak niższa czułość w porównaniu z surowicą może prowadzić do niewykrycia próbek o niskim mianie wirusa. Wykazano, że pulowanie próbek wpływa na wyniki analiz, a brak istotnych różnic między TOPF i surowicą prosiąt obu płci wskazuje na możliwość wykorzystania tej matrycy do oceny statusu zdrowotnego całego miotu.

Uzyskane wyniki wskazują, że TOPF może być alternatywą dla surowicy w diagnostyce i monitorowaniu zakażeń PRRSV i PCV2 u świń. Jednocześnie konieczne

są dalsze badania w celu pełnej walidacji tej matrycy oraz standaryzacji interpretacji wyników.

Słowa kluczowe: płyn technologiczny, płyn technologiczny pozyskiwany wyłącznie z jąder, wirus zespołu rozrodczo-oddechowego świń, cirkowirus świń typu 2, przeciwciała, materiał genetyczny wirusa, prosięta, monitoring zakażeń

2. Abstract

Monitoring of viral infections in pig herds is key for animal health management. Serum is a routinely used diagnostic sample; however, its collection is associated with logistical, economic, and welfare limitations, which justifies the search for alternative diagnostic materials such as testicular-only processing fluid (TOPF). In the present study, the usefulness of TOPF in the diagnosis of infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2) was evaluated using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction/quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR/qPCR) tests dedicated to other types of samples, by analyzing TOPF samples and their corresponding serum samples. Additionally, the effect of sample pooling on the tests results and the possibility of using this sample to assess the health status of entire litters were evaluated.

In TOPF samples, the presence of antibodies and genetic material of PRRSV and PCV2 was confirmed. It was demonstrated that TOPF may constitute a useful matrix for ELISA tests; however, this requires appropriate modification of cut-off points. In molecular studies for PRRSV, moderate sensitivity of the method and a risk of obtaining false-negative results were demonstrated, with simultaneously high reliability of positive results after application of an optimal cut-off point. In the case of PCV2, the use of TOPF in the qPCR test showed high sensitivity and specificity and very good agreement with serum; however, lower sensitivity compared to serum may lead to failure to detect samples with a low viral titer. It was demonstrated that sample pooling affects the results of analyses, and the lack of significant differences between TOPF and serum from piglets of both sexes indicates the possibility of using this matrix to assess the health status of the entire litter.

The obtained results indicate that TOPF may be an alternative to serum in the diagnosis and monitoring of PRRSV and PCV2 infections in pigs. At the same time, further studies are necessary for full validation of this matrix and standardization of result interpretation.

Keywords: processing fluid, testicular-only processing fluid, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, antibodies, viral genetic material, piglets, infection monitoring.

3. Wykaz skrótów

AASV – (ang. *American Association of Swine Veterinarians*) – Amerykańskie Stowarzyszenie Lekarzy Weterynarii Specjalistów Chorób Świń

ACC – (ang. *accuracy*) – dokładność

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

Cap – (ang. *capsid protein*) – wirusowe białko kapsydu

Ct – (ang. *cycle threshold*) – wartość progowa cyklu

DPI – (ang. *days post infection*) – dni po zakażeniu

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

IgG – (ang. *immunoglobulin G*) – immunoglobuliny klasy G

IgM – (ang. *immunoglobulin M*) – immunoglobuliny klasy M

IHC – (ang. *immunohistochemistry*) – immunohistochemia

ISH – (ang. *in situ hybridization*) – hybrydyzacja in situ

K – (ang. *Cohen's kappa coefficient*) – współczynnik Kappa Cohena

M. hyopneumoniae – łac. *Mycoplasma hyopneumoniae*

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

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

OF – (ang. *oral fluid*) – płyn ustny

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

ORF – (ang. *open reading frame*) – otwarta ramka odczytu

OT – (ang. *optimal threshold*) – wartość optymalnego punktu odcięcia

PAM – (ang. *porcine alveolar macrophage*) – makrofag pęcherzykowy świni

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

PCV2 – (ang. *porcine circovirus type 2*) – cirkowirus świń typu 2

PCV2-RD – (ang. *PCV2-associated reproductive disease*) – zaburzenia rozrodu związane z cirkowirusem świń typu 2

PCV2-SD – (ang. *PCV2-associated systemic disease*) – zakażenie ogólnoustrojowe związane z cirkowirusem świń typu 2

PCV2-SI – (ang. *PCV2-associated subclinical infection*) – zakażenie subkliniczne związane z cirkowirusem świń typu 2

PCV2-AD – (ang. *PCV2-associated diseases*) – choroby związane z cirkowirusem świń typu 2

PDNS – (ang. *porcine dermatitis and nephropathy syndrome*) – zespół skórno-nerkowy świń

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

PRRS – (ang. *porcine reproductive and respiratory syndrome*) – zespół rozrodczo-oddechowy świń

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

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

qPCR – (ang. *quantitative polymerase chain reaction*) – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

RNA – (ang. *ribonucleic acid*) – kwas rybonukleinowy

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

RP – punkt odcięcia rekomendowany przez producenta testu

RT-qPCR – (ang. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją

S/P – (ang. *sample to positive control ratio*) – stosunek sygnału próbki do sygnału kontroli pozytywnej

SE – (ang. *sensitivity*) – czułość

SP – (ang. *specificity*) – swoistość

TMB – (ang. *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*) – 3,3',5,5'-tetrametylobenzydina

TOPF – (ang. *testicular-only processing fluid*) – płyn technologiczny pozyskany wyłącznie z jąder

4. Wstęp

Zdrowie zwierząt stanowi kluczowy czynnik determinujący efektywność produkcji trzody chlewnej. Intensyfikacja chowu, wzrost wielkości stad oraz globalizacja przemysłu przyczyniły się do zwiększenia presji zakaźnej i pojawienia się chorób o złożonej, wieloczynnikowej etiologii, których kontrola wymaga systematycznego monitoringu opartego na badaniach laboratoryjnych (VanderWaal i in., 2018; Alarcón i in., 2021).

Wśród patogenów świń szczególne znaczenie mają wirusy o właściwościach immunosupresyjnych, w tym wirus zespołu rozrodczo-oddechowego świń (ang. *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV) oraz cirkowirus świń typu 2 (ang. *porcine circovirus type 2*, PCV2), uznawane za jedne z najważniejszych czynników ograniczających opłacalność produkcji trzody chlewnej (Ouyang i in., 2019; Zhao i in., 2021). Pomimo rozwoju metod molekularnych i serologicznych, rutynowa diagnostyka oparta na indywidualnych próbkach krwi wiąże się z istotnymi ograniczeniami logistycznymi i ekonomicznymi, szczególnie w dużych stadach (Fablet i in., 2017; Trevisan i in., 2019). W związku z tym rośnie zainteresowanie alternatywnymi matrycami diagnostycznymi, takimi jak płyn technologiczny (ang. *processing fluid*, PF), który może dostarczać informacji o statusie zdrowotnym zwierząt przy mniejszych kosztach pozyskania, większej akceptacji ze strony hodowców i bez negatywnego wpływu na dobrostan zwierząt (Kikuti i in., 2022; López i in., 2022; Cezar i in., 2024).

4.1 PRRSV i znaczenie jego wczesnego wykrywania

PRRSV jest czynnikiem etiologicznym zespołu rozrodczo-oddechowego świń (ang. *porcine reproductive and respiratory syndrome*, PRRS), choroby o istotnym znaczeniu ekonomicznym w produkcji trzody chlewnej (Chand i in., 2012; Lunney i in., 2016). Wirus należy do rzędu *Nidovirales*, rodziny *Arteriviridae* i rodzaju *Betaarterivirus* (Brinton i in., 2021). Jest to otoczkowy wirus o genomie w postaci jednoniciowego RNA o dodatniej polarności (Kappes i in., 2015). Wyróżnia się dwa gatunki: *Betaarterivirus europensis* (PRRSV-1), dominujący w Europie, oraz *Betaarterivirus americense* (PRRSV-2), występujący głównie w Ameryce Północnej i Azji (Brinton i in., 2021; Ruedas-Torres i in., 2021; Franzo i in., 2025). W niniejszej pracy oba gatunki określane są zbiorczo jako PRRSV, odnosząc się do ich roli jako czynników etiologicznych PRRS – choroby, której objawy mogą obejmować zaburzenia ze strony układu oddechowego, obniżone przyrosty masy ciała, wzrost śmiertelności, a u loch i loszek stada

podstawowego zaburzenia w rozrodzie. Nasilenie objawów klinicznych choroby i wpływ ekonomiczny pojawienia się PRRS w stadzie znacząco różnią się w zależności od gatunku i szczepu wirusa, stanu odporności, wieku zakażonych świń, obecności współzakażeń innymi patogenami i stadium choroby. Choroba może mieć także przebieg subkliniczny (Goyal i in., 1993; Zimmerman i in., 2019).

Komórki podatne na zakażenie *in vivo* obejmują głównie monocyty i makrofagi, przy czym zakażenie występuje najczęściej w podgrupach makrofagów obecnych w płucach, łożysku i tkankach limfoidalnych (Van Breedam i in., 2010). Głównymi komórkami docelowymi replikacji wirusa w warunkach *in vivo* są makrofagi pęcherzykowe świń (ang. *porcine alveolar macrophages*, PAM) (Duan i in., 1998). PRRSV replikuje także w komórkach nabłonka jąder i makrofagach obecnych w jądrach (Sur i in., 1997). PRRSV replikuje się głównie w makrofagach i komórkach dendrytycznych płuc oraz górnych dróg oddechowych, prowadząc do wiremii już po 6–12 godzinach od zakażenia (Delputte i in., 2007; Lunney i in. 2016). Materiał genetyczny PRRSV można wykryć metodami molekularnymi we krwi i tkance płucnej po 6–48 godzinach od zakażenia, a największa jego ilość wykrywana jest najczęściej między 4–14 dniem od zakażenia (ang. *days post infection*, DPI), w zależności od szczepu i istniejącej wcześniej odporności (Zimmerman i in., 2019). Większość obserwowanych objawów klinicznych PRRS występuje w fazie ostrej zakażenia, gdy miana wirusa osiągają szczyt. Później obserwuje się szybki spadek miana wirusa w tkankach, a większość świń przestaje być wiremiczna po 21–28 DPI (Zimmerman i in., 2019). U świń zakażonych PRRSV może być obecny w organizmie przez miesiące po zaobserwowaniu ostatnich objawów klinicznych (Bierk i in., 2001; Wills i in., 1997). Replikacja wirusa może jednak trwać nawet 250 DPI, co oznacza, że w przypadku konwencjonalnego systemu produkcji zakażenie PRRSV może utrzymywać się przez cały okres tuczu (Lunney i in., 2016; Wills i in., 2003). Kinetyka produkcji przeciwciał podczas zakażenia PRRSV również została dokładnie zbadana. Immunoglobuliny klasy M (ang. *immunoglobulin M*, IgM) specyficzne dla PRRSV można wykryć w 7 DPI; osiągają one szczytowe miana w 14–21 DPI i szybko spadają do niewykrywalnego poziomu w 40 DPI. Immunoglobuliny klasy G (ang. *immunoglobulin G*, IgG) specyficzne dla PRRSV można wykryć między 7 a 9 DPI; szczyt mian IgG przypada w 21–28 DPI. Przeciwciała tej klasy mogą utrzymywać się w surowicy przez kilka miesięcy (Dee i in., 1996; Desrosiers i in., 2002; Labarque i in., 2000; Loemba i in., 1996; López i Osorio 2004; Yoon i in., 1994).

Wczesne wykrycie PRRSV jest niezwykle ważne. Dlatego też w profesjonalnym chowie i hodowli świń powinny być prowadzone programy monitoringowe w tym kierunku. Wirus PRRS charakteryzuje się wysoką zmiennością genetyczną wynikającą z mutacji punktowych oraz rekombinacji, co sprzyja powstawaniu nowych wariantów wirusa (Domingo i in., 1997; Martín-Valls i in., 2014). Zmienność ta może prowadzić do obniżenia skuteczności szczepień i utrudniać kontrolę zakażeń w stadach (Clilverd i in., 2023; Chand i in., 2012).

4.2 PCV2 i znaczenie jego wczesnego wykrywania

PCV2 należy do rodzaju *Circovirus*, rodziny *Circoviridae* i jest jednym z najmniejszych wirusów, których genom ma postać kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *deoxyribonucleic acid*, DNA) (Varsani i in., 2024). Obecnie rodzaj *Circovirus* składa się z czterech gatunków: cirkowirusa świń typu 1 (ang. *porcine circovirus type 1*, PCV1), PCV2, cirkowirusa świń typu 3 (ang. *porcine circovirus type 3*, PCV3) i cirkowirusa świń typu 4 (ang. *porcine circovirus type 4*, PCV4) (Tischer i in., 1982; Harding i in., 2007; Palinski i in., 2017; Zhang i in., 2019; Tan i in., 2020). W ostatnim czasie opisano nowy wirus świń, nazwany cirkowirusem świń typu 5 (ang. *porcine circovirus type 5*, PCV5) (Liu i in., 2025). Zgodnie z obowiązującym systemem klasyfikacji wyróżnia się osiem genotypów PCV2 (PCV2a do PCV2h) (Franzo i in., 2018), jednak najnowsze badania wskazują na istnienie dziewiątego genotypu – PCV2i, którego status jako odrębnej jednostki taksonomicznej jest obecnie przedmiotem badań (Wang i in., 2020; Franco i in., 2024; Xiao i in., 2024). PCV2 jest szeroko rozpowszechniony u świń domowych w Europie (Melegari i in., 2025; Rudova i in., 2022; Almeida i in., 2025; Pigińska-Vjačeslavova i in., 2018) oraz na innych kontynentach (Huang i in., 2021; Ciacchi-Zanella i in., 2009). Wysoka częstość zakażeń PCV2 stwierdzana jest również u dzików (łac. *Sus scrofa*) (Šolaja i in., 2025; Almeida i in., 2025; Rudova i in., 2022; Vicente i in., 2004; Melegari i in., 2025; Reiner i in., 2010; Castro i in., 2012; Gong i in., 2023).

PCV2 jest uznawany za jeden z najważniejszych patogenów świń na świecie, ponieważ choroby z nim związane mają znaczący, negatywny wpływ na zdrowie świń, oraz rentowność produkcji trzody chlewnej (Rose i in., 2011). Wirus ma powinowactwo przede wszystkim do komórek immunokompetentnych, dlatego zakażenie tym wirusem prowadzi do immunosupresji i zwiększonej podatności na zakażenia wtórne (Fehér i in., 2023). PCV2 powoduje zespół chorób, które określa się zbiorczo, razem z wieloma innymi stanami klinicznymi, w których udział może mieć wspomniany patogen (takimi

jak zespół oddechowy czy zaburzenia ze strony układu pokarmowego) jako choroby związane z cirkowirusem świń typu 2 (ang. *porcine circovirus type 2-associated diseases*, PCV2-AD) (Segalés, 2012).

W 2022 roku Segalés i Sibila dokonali wyodrębnienia poszczególnych zespołów chorobowych wśród PCV2-AD: zakażenie subkliniczne związane z cirkowirusem świń typu 2 (ang. *porcine circovirus type 2 subclinical infection*, PCV2-SI), zakażenie ogólnoustrojowe związane z cirkowirusem świń typu 2 (ang. *porcine circovirus type 2 systemic disease*, PCV2-SD), zaburzenia rozrodu związane z cirkowirusem świń typu 2 (ang. *porcine circovirus type 2 reproductive disease*, PCV2-RD) oraz zespół skórno-nerkowy świń (ang. *porcine dermatitis and nephropathy syndrome*, PDNS). W przypadku postaci subklinicznej jedyną zauważalną zmianą może być zmniejszenie przyrostów masy ciała (Segalés i Sibila, 2022). Objawami zakażenia uogólnionego są wyniszczenie i słaba kondycja zwierząt, utrata masy ciała i zmniejszenie jej przyrostów oraz ewentualne pojawienie się objawów patologicznych ze strony układu pokarmowego lub oddechowego. W przypadku PCV2-RD mogą pojawić się poronienia i rodzenie zмумifikowanych prosiąt oraz problemy z płodnością. Z kolei dominującym objawem klinicznym PDNS są ciemnoczerwone plamy, pojawiające się głównie na skórze kończyn miednicznych i w pachwinach (Segalés i Sibila, 2022). Różnice w zjadliwości pomiędzy różnymi podtypami PCV2 nie zostały jednoznacznie potwierdzone i nadal nie jest jasne, czy ciężkość przebiegu chorób związanych z PCV2 wynika z indywidualnych cech poszczególnych podtypów, czy też z innych czynników, takich jak współzakażenia innymi patogenami lub status immunologiczny gospodarza, które mogą nasilać kliniczną manifestację choroby (Carman i in., 2006; Timmusk i in., 2008; Guo i in., 2012; Opriessnig i in., 2014; Cho i in., 2023; Oh i in., 2022; Suh i in., 2021).

Badania nad rozmieszczeniem PCV2 w organizmie świń potwierdzają szeroki zakres tkankowego tropizmu tego patogenu. PCV2 aktywnie replikuje się w różnych narządach i komórkach układu limfatycznego (Calsamiglia i in., 2002; Yu i in., 2007). DNA PCV2 wykrywano także w krwi pępowinowej, łożysku i nasieniu (Fan i in., 2023). W przypadku odpowiedzi humoralnej na zakażenie PCV2, u świń wolnych od specyficznych gatunkowo patogenów (ang. *specific pathogen free*) zakażonych PCV2 w warunkach eksperymentalnych, przeciwciała można wykryć już w 10–15 DPI. W badaniach eksperymentalnych wcześniejsza serokonwersja oraz wyższe poziomy przeciwciał neutralizujących były związane z ograniczeniem namnażania PCV2 (Meerts i in., 2005). Istotną rolę w ochronie prosiąt przed zakażeniem odgrywają przeciwciała

siarowe, przekazywane przez lochę w pierwszych godzinach życia prosiąt. Im wyższy poziom przeciwciał matczynych, tym niższe ryzyko wystąpienia wiremii u prosiąt (McKeown i in., 2005; Ostanello i in., 2005; Saha i in., 2014), przy czym wykazano, że wyższe miana przeciwciał przeciwko PCV2 u loch wiążą się z większym prawdopodobieństwem ich wykrycia u prosiąt (Kekarainen i Segalés, 2015). Wraz ze spadkiem poziomu przeciwciał matczynych nabytych z siarą wzrasta podatność prosiąt na zakażenie PCV2 (Grau-Roma i in., 2009; Larochelle i in., 2003; Rodríguez-Arrioja i in., 2002).

Obecnie główną metodą zapobiegania i kontroli PCV2 jest szczepienie. Szczepionki przeciwko PCV2 są skuteczne w zapobieganiu klinicznej postaci choroby, jednak nie chronią przed zakażeniem ani replikacją wirusa w organizmie (Franzo i Segalés, 2020). Pomimo wysokiej skuteczności szczepień, w warunkach terenowych nadal obserwuje się przypadki występowania chorób związanych z PCV2, w tym zachorowania i upadki świń uprzednio szczepionych, co może wynikać z niewystarczającej odpowiedzi poszczepiennej (Xiao i in., 2012). Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, zmiany genotypowe oraz pojawianie się nowych wariantów PCV2 mogą być związane m.in. z presją immunologiczną wynikającą ze szczepień lub naturalnych infekcji, międzynarodowym przemieszczaniem zwierząt i materiału hodowlanego oraz ewolucją wirusa (Franzo i in., 2015; Franco i Segalés, 2020; Karuppannan i in., 2017). Do innych, prawdopodobnie częstszych, przyczyn niepowodzeń szczepień i przełamывania odporności u immunizowanych świń należą błędy w technice szczepień oraz niekorzystne warunki utrzymania, wpływające na funkcjonowanie układu odpornościowego zwierząt.

Choroby związane z PCV2 powodują istotne straty ekonomiczne w produkcji trzody chlewnej, wynikające ze zwiększonej śmiertelności, zahamowania przyrostów oraz zaburzeń rozrodu. Dodatkowe koszty generują diagnostyka, leczenie i działania profilaktyczne. W obliczu zmienności genotypów PCV2 i możliwej redukcji skuteczności szczepień szczególnego znaczenia nabiera regularny monitoring laboratoryjny, umożliwiający wczesne wykrycie zakażenia i dostosowanie strategii kontroli.

4.3 Diagnostyka laboratoryjna w monitorowaniu zakażeń PRRSV i PCV2

Rutynowy nadzór przyżyciowy nad zakażeniami PRRSV i PCV2 opiera się przede wszystkim na badaniu próbek surowicy, która stanowi podstawowy materiał zarówno do badań molekularnych, jak i serologicznych.

W przypadku PRRSV najczęściej stosuje się test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) wykrywający swoiste przeciwciała klasy IgG oraz test ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) umożliwiający identyfikację materiału genetycznego wirusa. Inne metody, takie jak izolacja wirusa w hodowlach komórkowych czy badania immunohistochemiczne wycinków tkanek, nie są powszechnie stosowane z uwagi na wysokie koszty, czasochłonność i konieczność posiadania specjalistycznego wyposażenia laboratoriów (Pejsak i Podgórska, 2021a).

Test ELISA jest relatywnie tanią i łatwo dostępną metodą, pozwalającą na ocenę statusu serologicznego stada niezależnie od wariantów krążących w populacji (Pejsak i Podgórska, 2021a). Alternatywnie materiałem do badań mogą być także próbki płynu ustnego (ang. *oral fluid*, OF). Z kolei RT-qPCR pozwala na szybką i wczesną detekcję PRRSV, a większość dostępnych zestawów diagnostycznych umożliwia różnicowanie gatunków wirusa. Jako przyżyciowy materiał diagnostyczny można wykorzystać surowicę, nasienie, a także OF (Pejsak i Podgórska, 2021a).

W praktyce terenowej monitoring PRRSV w stadach świń opiera się na badaniach przekrojowych, obejmujących różne grupy wiekowe świń, w których zaleca się pobieranie co najmniej 6 próbek w każdej grupie, przy czym liczba ta powinna być dostosowana do wielkości stada (Pejsak i Podgórska, 2021a).

Zgodnie z wytycznymi Amerykańskiego Stowarzyszenia Lekarzy Weterynarii Specjalistów Chorób Świń (ang. *American Association of Swine Veterinarians*, AASV), stabilny status stada w odniesieniu do PRRSV stwierdza się po uzyskaniu czterech kolejnych negatywnych wyników badania RT-qPCR w kierunku PRRSV w surowicy pobranej od reprezentatywnej liczby prosiąt w wieku okołodsadzeniowym, w odstępach nie dłuższych niż 30 dni, przez okres 90 dni przy liczebności próby zapewniającej 95% prawdopodobieństwo wykrycia zakażenia przy oczekiwanej prewalencji co najmniej 10% (Holtkamp i in., 2011).

Również w przypadku PCV2 podstawową przyżyciową matrycą diagnostyczną pozostaje surowica, badana metodami ELISA oraz ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR), które służą do oceny występowania odpowiednio przeciwciał lub obecności wirusa w stadzie.

Materiał genetyczny PCV2 rutynowo wykrywa się za pomocą qPCR w różnych typach próbek, m.in. w surowicy, krwi, płynie ustnym, węzłach chłonnych czy sercu poronionych płodów. Zaproponowano wartości progowe związane z ilością wykrywanego w tych próbkach wirusa, służące rozróżnieniu zwierząt zakażonych subklinicznie i klinicznie (Segalés i Sibila, 2022), jednak mogą one różnić się w zależności od zastosowanego protokołu qPCR (Hjulsager i in., 2009). Co istotne, nie zwalidowano ich dotychczas dla wszystkich potencjalnych matryc diagnostycznych, co utrudnia interpretację wyników u zwierząt w różnym wieku w stadach objętych programami kontroli PCV2 (Woźniak i in. 2019). Połączenie wykrywania PCV2 metodami molekularnymi z sekwencjonowaniem Sangera lub sekwencjonowaniem nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*) umożliwia identyfikację genotypów uczestniczących w infekcji.

Diagnostyka histopatologiczna oraz techniki takie jak hybrydyzacja *in situ* (ang. *in situ hybridization*, ISH) i immunohistochemia (ang. *immunohistochemistry*, IHC) mogą być wykorzystywane głównie w przypadku badania narządów pobranych pośmiertnie, jednak ze względu na koszt oraz czasochłonność ich zastosowanie w praktyce jest ograniczone (Pejsak i Podgórska, 2021b). IHC i ISH stanowią jednak ważne narzędzia diagnostyczne w rozpoznawaniu PCV2-AD, zwłaszcza w połączeniu z oceną histopatologiczną, ponieważ umożliwiają lokalizację antygenu PCV2 (IHC) oraz jego genomu (ISH) w tkankach (Rosell i in., 1999). Informacje te dostarczają cennych danych dotyczących tropizmu tkankowego i udziału wirusa w patogenezie zmian. Pomimo, że narzędzia molekularne, takie jak qPCR, zapewniają bardzo wysoką czułość (ang. *sensitivity*, SE) oraz umożliwiają oznaczenia ilościowe, opieranie diagnozy wyłącznie na wynikach qPCR stanowi istotne ograniczenie w diagnostyce chorób związanych z PCV2. Technika ta nie pozwala bowiem na ocenę związku między obecnością wirusa, a obserwowanymi zmianami tkankowymi i nie umożliwia identyfikacji komórek docelowych wirusa (Segalés i Sibila, 2025). Ograniczenia te wskazują na potrzebę łączenia metod molekularnych z oceną histopatologiczną oraz technikami IHC/ISH, co pozwala na uzyskanie pełniejszego obrazu procesów patogenetycznych oraz kompleksową charakterystykę przypadków PCV2-AD. Brak jest jednak jasno sprecyzowanych wytycznych co do liczebności i częstotliwości pobierania próbek, które pozwalałyby na pełną standaryzację monitoringu. Przy interpretacji wyników serologicznych należy pamiętać, że nie ma możliwości rozróżnienia przeciwciał poszczepiennych od powstałych w wyniku kontaktu z wirusem terenowym (Pejsak i

Podgórska, 2021b). Rozpoznanie PCV2-SD opiera się na współwystępowaniu objawów klinicznych, mikroskopowych zmian w narządach limfatycznych (w szczególności w węzłach chłonnych) oraz wykazaniu materiału genetycznego lub antygeny PCV2 w obrębie zmian histopatologicznych (Segalés i Sibila, 2025).

Pomimo wysokiej wartości diagnostycznej, pobieranie próbek krwi w rutynowym monitoringu jest czasochłonne, wymaga unieruchomienia zwierząt i zaangażowania personelu, oraz wiąże się z ryzykiem powikłań, w tym śmierci. Przy dużych stadach stanowi również istotne obciążenie ekonomiczne. Alternatywą jest OF będący mieszaniną śliny oraz składników pochodzących z górnych dróg oddechowych, dziąseł, ran w jamie ustnej i resztek pokarmowych (Challacombe i in., 1978; Simer, 2005). Jednak uzyskanie odpowiedniej ilości OF do badań może być czasami trudne lub niemożliwe ze względu na wiek zwierząt czy stan kliniczny (apatia, będąca częstym objawem wielu chorób, która może prowadzić u świń do braku chęci do interakcji ze sznurami). Czynniki środowiskowe, takie jak wysoka lub niska temperatura, mogą również wpływać na skłonność do interakcji ze sznurami. Pobieranie OF jest najbardziej efektywne u warchlaków i tuczników. Ponadto nie jest możliwe pobieranie próbek tą metodą od bardzo młodych prosiąt, które nie umieją jeszcze żuć sznurów i nie są nimi zainteresowane (Fablet i in., 2017, Turlewicz-Podbielska i in., 2020).

Klasyczna diagnostyka przyżyciowa oparta o badanie próbek surowicy i OF stanowi podstawę nadzoru nad PRRSV i PCV2, jednak jej ograniczenia techniczne i ekonomiczne uzasadniają poszukiwanie alternatywnych matryc. Jednym z obiecujących rozwiązań jest PF pozyskiwany podczas kastracji prosiąt, omówiony w kolejnym podrozdziale.

4.4 Płyn technologiczny

PF definiuje się jako surowiczo-krwisty płyn pozyskiwany z tkanek podczas kastracji i obcinania ogonów prosiąt (López i in., 2018). W stadach, w których rutynowo wykonuje się chirurgiczną kastrację knurków, jego pobranie nie wymaga dodatkowych procedur, co pozwala traktować tę matrycę jako niewymagającą dodatkowych zabiegów i w tym znaczeniu można ją uznać za nieinwazyjną. PF stanowi obiecujące narzędzie w monitorowaniu zakażeń w stadach o pełnym cyklu produkcji, gdyż może być łatwo pozyskiwany od prosiąt w wieku do 7 dni. Umożliwia to badanie dużej liczby zwierząt w okresie, w którym pobieranie OF jest niemożliwe, a pobieranie krwi wiąże się z większym ryzykiem powikłań.

Obcinanie ogonów jest wykonywane przede wszystkim w celu zapobiegania kanibalizmowi, jednak przepisy europejskie stanowią, że zabiegu tego nie należy wykonywać rutynowo, a jedynie w określonych sytuacjach (Dyrektywa Rady 2008/120/WE z dnia 18 grudnia 2008 r. ustanawiająca minimalne normy ochrony świń). Praktyki te pozwalają na pobieranie próbek, które mogą być wykorzystane do monitorowania statusu epidemiologicznego stada (Vilalta i in., 2019).

W powstałej w 2010 roku „Deklaracji Europejskiej na temat alternatyw dla chirurgicznej kastracji świń” przewidziano, że od 2018 chirurgiczna kastracja świń powinna być całkowicie wycofana (De Briyne i in., 2016). Większość krajów europejskich nie osiągnęła jednak jeszcze celu wyznaczonego w deklaracji, a chirurgiczna kastracja knurków jest nadal powszechna w większości ferm trzody chlewnej (Bonneau i in., 2019). Dostępnych jest kilka metod alternatywnych dla kastracji chirurgicznej w celu eliminacji zapachu płciowego: ubój świń przed osiągnięciem dojrzałości płciowej (Dunshea i in., 2001), produkcja niekastrowanych samców, immunokastracja, seksowanie nasienia w celu uzyskania potomstwa płci żeńskiej, chemiczna destrukcja tkanki jąder, podawanie hormonów hamujących oś podwzgórze–przysadka–gonady oraz chirurgiczna kastracja z zastosowaniem analgezji (Bonneau i in., 2019). W przestrzeni publicznej pojawiają się obawy dotyczące alternatywnych metod dla kastracji chirurgicznej knurków ze względu na dodatkowe koszty dla rolników i niepewność co do nastawienia konsumentów do mięsa pochodzącego od świń kastrowanych farmakologicznie. W rezultacie można przyjąć, że całkowity zakaz kastracji chirurgicznej, niezależnie od tego, czy jest ona przeprowadzana ze znieczuleniem, czy bez, może nie nastąpić w krótkim okresie. Kastracja chirurgiczna prosiąt prawdopodobnie będzie nadal dozwolona w Europie przez następne kilka dekad. Ponadto w innych krajach zajmujących się produkcją trzody chlewnej, takich jak Chiny, USA i Brazylia, kwestia zakazu kastracji nie została jeszcze nawet podniesiona. Wszystko to powoduje, że badania nad wykorzystaniem w celach diagnostycznych, zwłaszcza PF pozyskanego wyłącznie z jąder (ang. *testicular-only processing fluid*, TOPF), mogą dostarczyć cennych wyników, z których hodowcy będą mogli korzystać jeszcze przez wiele lat.

4.5 Zastosowanie PF w diagnostyce i monitoringu PRRSV

PF aktualnie znajduje najszersze zastosowanie w monitorowaniu zakażeń PRRSV w stadach o pełnym cyklu produkcji lub odchowujących prosięta. Mimo licznych doniesień potwierdzających jego wartość diagnostyczną, konieczne są dalsze badania w

celu pełnej walidacji metod z wykorzystaniem tej matrycy i ustanowienia jej jako standardu w rutynowej diagnostyce zakażeń PRRSV. Patogeneza zakażenia dodatkowo wspiera zasadność stosowania PF w badaniach, ponieważ wykazano, że PRRSV replikuje nie tylko w makrofagach płucnych, ale także w komórkach nabłonka jąder oraz w makrofagach obecnych w tkance jądrowej (Sur i in., 1997). Co więcej, niedawne badania potwierdziły, że wirus wykrywany jest w wielu strukturach męskiego układu rozrodczego, w tym w jądrach, najądrzach, pęcherzykach nasiennych, gruczole krokowym oraz gruczołach opuszkowo-cewkowych (Huang i in., 2024). Wyniki te wskazują, że obecność wirusa w materiale pozyskiwanym podczas kastracji jest wysoce prawdopodobna, a wykorzystanie PF w monitoringu PRRSV może stanowić praktyczne i mniej inwazyjne uzupełnienie klasycznych metod diagnostycznych. W kilku badaniach wykazano, że PF może być czułą i użyteczną matrycą do wykrywania materiału genetycznego PRRSV u wiremicznych prosiąt (López i in., 2018; López i in., 2020; López i in., 2021; Trevisan i in., 2019; Vilalta i in., 2018; Vilalta i in., 2019; Vilalta i in., 2021). Należy w tym miejscu zaznaczyć, że dotychczasowe badania dotyczyły głównie próbek pulowanych, a brak jest danych na temat ewentualnych konsekwencji pulowania próbek PF w aspekcie uzyskanych wyników.

Badania nad wykorzystaniem pulowanych próbek PF jako matrycy diagnostycznej w RT-qPCR wykazały jego wysoką zgodność z wynikami uzyskiwanymi z surowicy oraz dobre parametry diagnostyczne, w tym wysoką SE i swoistość (ang. *specificity*, SP) (Vilalta i in., 2018). PF znalazł również zastosowanie w długoterminowym monitorowaniu zakażeń PRRSV w stadach świń, wykazując wysoką zgodność wyników z badaniami serologicznymi oraz większą skuteczność wykrywania materiału genetycznego wirusa w porównaniu z tradycyjnym próbkobranem opartym na surowicy (López i in., 2018; Trevisan i in., 2019). Nowsze badania wskazują ponadto, że TOPF może charakteryzować się jeszcze wyższą SE w porównaniu z innymi matrycami, takimi jak PF pozyskiwany z ogonów czy wymazy z wymienia, co podkreśla jego potencjał w diagnostyce zakażeń wirusowych u prosiąt (Vilalta i in., 2021).

Wciąż niewiele wiadomo na temat wpływu pulowania próbek PF i TOPF na zdolność komercyjnych testów diagnostycznych dedykowanych do innych rodzajów próbek, zarówno serologicznych jak i molekularnych, do prawidłowej klasyfikacji próbki. Badania dotyczące strategii pulowania próbek PF odnosiły się dotychczas do diagnostyki molekularnej PRRSV, natomiast brak jest danych dotyczących pulowania próbek tej matrycy w badaniach ukierunkowanych na wykrywanie przeciwciał.

Wykazano, że skuteczność wykrywania RNA PRRSV zależy przede wszystkim od poziomu wirerii u zakażonych prosiąt oraz ich udziału w próbce zbiorczej (Vilalta i in., 2019; López i in., 2020). Przy wysokim poziomie wirerii możliwe jest łączenie większej liczby próbek bez utraty zdolności detekcji wirusa, natomiast przy niskim poziomie zakażenia SE metody ulega obniżeniu. Jednocześnie sugeruje się, że ograniczenie stopnia pulowania pozwala utrzymać wysokie prawdopodobieństwo wykrycia PRRSV nawet przy niskiej częstotliwości występowania zakażenia w populacji (López i in., 2021).

4.6 Zastosowanie PF w wykrywaniu i monitoringu PCV2

Od momentu opisanego pierwszych przypadków klinicznych zakażeń PCV2, surowica była powszechnie wykorzystywana do wykrywania wirerii oraz monitorowania poziomu przeciwciał swoistych dla PCV2 u świń (Carasova i in., 2007). W 2008 roku zidentyfikowano OF jako kolejną matrycę diagnostyczną, która może być wykorzystana jako próbka zbiorcza, umożliwiającą wykrywanie obecności PCV2 w populacji świń poprzez zastosowanie metody PCR (Henao-Diaz i in., 2020). Wciąż jest niewiele danych dotyczących wykorzystania PF do monitoringu i wykrywania PCV2. Wykazano, że w warunkach eksperymentalnego zakażenia knury mogą okresowo wydalać PCV2 w nasieniu (Larochelle i in. 2000; Madson i in. 2009). W jednym z badań powiązано także obecność PCV2 ze zmianami w obrębie układu rozrodczego samców (Opriessnig i in., 2006). W związku z tym matryce pozyskiwane z narządów rozrodczych knurów, takie jak PF czy TOPF, mogą potencjalnie stanowić wartościowy materiał do wykrywania PCV2.

Pierwsze doniesienia z 2019 roku dotyczące wykorzystania PF jako matrycy do wykrywania DNA PCV2 metodą PCR u prosiąt wskazały na jego przydatność w monitorowaniu statusu zakażenia w stadach (Castevens i in., 2019; Trevisan i in., 2020). Wykazano, że PF umożliwia klasyfikację grup zwierząt jako PCV2-dodatnie i PCV2-ujemne (Trevisan i in., 2020). Kolejne badania potwierdziły wysoką użyteczność zarówno PF, jak i TOPF jako matryc do wykrywania PCV2, wskazując na ich większą SE w porównaniu z tradycyjnymi próbkami, takimi jak surowica czy wymazy (Fan i in., 2023; Fan i in., 2025). Wyniki te sugerują, że PF i TOPF mogą być skutecznymi narzędziami do wczesnego wykrywania zakażeń PCV2 oraz innych cirkowirusów u prosiąt. Dodatkowo, analizy epidemiologiczne wskazują, że PF jest obecnie jedną z najczęściej wykorzystywanych matryc do monitorowania obecności PCV2 w stadach świń, a wartości progowe cykli (ang. *cycle threshold*, Ct) uzyskiwane w badaniach

molekularnych mogą mieć znaczenie prognostyczne w ocenie ryzyka wystąpienia klinicznej postaci choroby (Cezar i in., 2024).

PCV2 może być przenoszony wertykalnie (Madson i in., 2011). Wysoka wykrywalność PCV2 w TOPF może odzwierciedlać wczesne zakażenie prosiąt lub możliwość transmisji wertykalnej, a wczesne zakażenie PCV2, szczególnie przed 7. tygodniem życia, wiązane z większym ryzykiem wystąpienia chorób związanych z PCV2 po odsadzeniu (Rose i in., 2009). Biorąc pod uwagę powyższe, TOPF jest obiecującą matrycą do wykrywania materiału genetycznego. Warto mieć na uwadze, że dodatni wynik testu PCR nie jest jednak wystarczający do potwierdzenia klinicznej postaci choroby wywoływanej przez PCV2 bez przeprowadzenia dodatkowych badań diagnostycznych, pozwala jednak zidentyfikować stado jako zakażone. Na rozwój PCV2-AD wpływa wiele czynników, takich jak odporność prosiąt, warunki utrzymania w gospodarstwie oraz droga zakażenia (Segalés i Sibila, 2022). Do rozpoznania PCV2-AD konieczne jest współistnienie trzech elementów: objawów klinicznych (obniżonego przyrostu masy ciała u zwierząt, zaburzeń w rozrodzie), zmian histopatologicznych oraz obecności wirusa, przede wszystkim w tkankach limfatycznych (Madson i in., 2011; Segalés i Sibila, 2022). Obserwacje wskazują, że ryzyko wystąpienia objawów klinicznych rośnie wraz ze spadkiem wartości Ct w teście PCR (Cezar i in., 2024).

Choć dane na temat wykrywania przeciwciał przeciwko PCV2 w PF i TOPF są nadal ograniczone, doniesienia (Trevisan i in., 2020) sugerują, że wyniki badań uzyskane z tych próbek mogą być przydatne w ocenie statusu serologicznego prosiąt we wczesnym okresie życia.

4.7 Znaczenie próbek zbiorczych

W ciągu ostatniej dekady wzrosło znaczenie próbek zbiorczych w monitoringu stad świni (Trevisan i in., 2019; Cezar i in., 2024). Alternatywne matryce, takie jak PF czy OF, umożliwiają efektywny nadzór przy niższych kosztach. W stadach wykorzystujących PF do nadzoru nad PRRSV koszt diagnostyki obejmującej 100% populacji prosiąt oszacowano na 0,077 EUR (0,086 USD) na odsadzoną świnię. Dla porównania, badanie tej samej populacji przy użyciu indywidualnych próbek surowicy wiązałoby się z kosztem 4,48 EUR (5,00 USD) na sztukę (López i in., 2020). Jednak pobieranie krwi od poszczególnych zwierząt wciąż jest metodą najczęściej stosowaną w praktyce weterynaryjnej do monitorowania i badania stanu zdrowia stada, pomimo faktu, że

matryce alternatywne można uzyskać w tańszy, bezpieczniejszy i często nieinwazyjny sposób (De Lucia i Edwards 2019; Fablet i in., 2017).

Metody oparte na próbkach zbiorczych mogą przy odpowiednim podejściu zwiększać prawdopodobieństwo wykrycia krążącego patogenu bez zwiększania kosztów i nakładu pracy (Magalhaes i in., 2021; López i in., 2018). W praktyce próbki PF pobiera się zazwyczaj z całych kojców lub od większych grup świń, co umożliwia przebadanie wielu osobników jednocześnie. Ma to szczególne znaczenie przy niskiej częstotliwości występowania patogenu, gdy w celu uzyskania reprezentatywności konieczne jest zapewnienie co najmniej 95% prawdopodobieństwa wykrycia osobników dodatnich w badanej grupie. Należy jednak pamiętać, że prawdopodobieństwo wykrycia patogenów w próbkach zbiorczych maleje wraz ze spadkiem prewalencji. W badaniu Romagosa i in. (2012), prawdopodobieństwo wykrycia wirusa grypy świń (ang. *swine influenza virus*, SIV) w OF wynosiło 99%, jeśli częstość występowania była $> 18\%$ i spadało do 69%, jeśli częstość występowania wynosiła 9%. Powyższe wskazuje, że aby efektywnie wykorzystywać próbki zbiorcze należy w pierwszej kolejności wykazać, czy i w jaki sposób pulowanie wpływa na uzyskane wyniki oraz jak dużą liczbę próbek można pulować.

5. Hipoteza i cele badań

Podczas gdy PF wydaje się być praktycznym i ekonomicznym materiałem do monitorowania stanu zdrowia świń, nie wykonano dotychczas badań, które oceniłyby przydatność PF uzyskanego wyłącznie z jąder (TOPF) jako matrycy dla komercyjnych testów ELISA oraz PCR, wykorzystywanych do wykrywania ważnych z ekonomicznego punktu widzenia patogenów świń, jakimi są PRRSV i PCV2 oraz swoistych wobec nich przeciwciał. Ponadto biorąc pod uwagę, że w przypadku wykorzystania próbek pulowanych, co obecnie najczęściej ma miejsce w praktyce terenowej, część próbek będzie pochodziła od zwierząt PRRSV- lub PCV2-pozytywnych, a część od zwierząt PRRSV- i PCV2-negatywnych, należy sprawdzić, czy postępowanie takie nie wpłynie na ocenę rzeczywistej sytuacji epidemiologicznej w stadzie. Dotyczy to zarówno badań serologicznych, jak i molekularnych. Biorąc pod uwagę fakt, iż obcinanie ogonów prosiętom nie może być obecnie zabiegiem rutynowym, w badaniach zdecydowano się na model PF składający się wyłącznie z płynu uzyskanego z jąder (Dyrektywa Rady 2008/120/WE z dnia 18 grudnia 2008 r. ustanawiająca minimalne normy ochrony świń). W związku z takim podejściem należy dodatkowo zweryfikować, czy wyniki uzyskane z TOPF są reprezentatywne dla całego miotu (knurków i loszek).

5.1 Hipoteza

Na podstawie aktualnego stanu wiedzy postawiono cztery hipotezy badawcze:

1. TOPF może stanowić próbkę alternatywną dla surowicy w diagnostyce i monitorowaniu zakażeń PRRSV oraz PCV2.
2. Wykorzystując komercyjne testy diagnostyczne, możliwe jest wykrycie materiału genetycznego PRRSV i PCV2 oraz przeciwciał przeciwko tym patogenom w TOPF, a wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi z surowicy.
3. Łączenie indywidualnych próbek TOPF (tzw. pulowanie próbek) i badanie jako próbki zbiorcze nie wpływa na uzyskane wyniki.
4. Wyniki uzyskane z analiz TOPF są reprezentatywne dla całego miotu.

5.2 Cel pracy

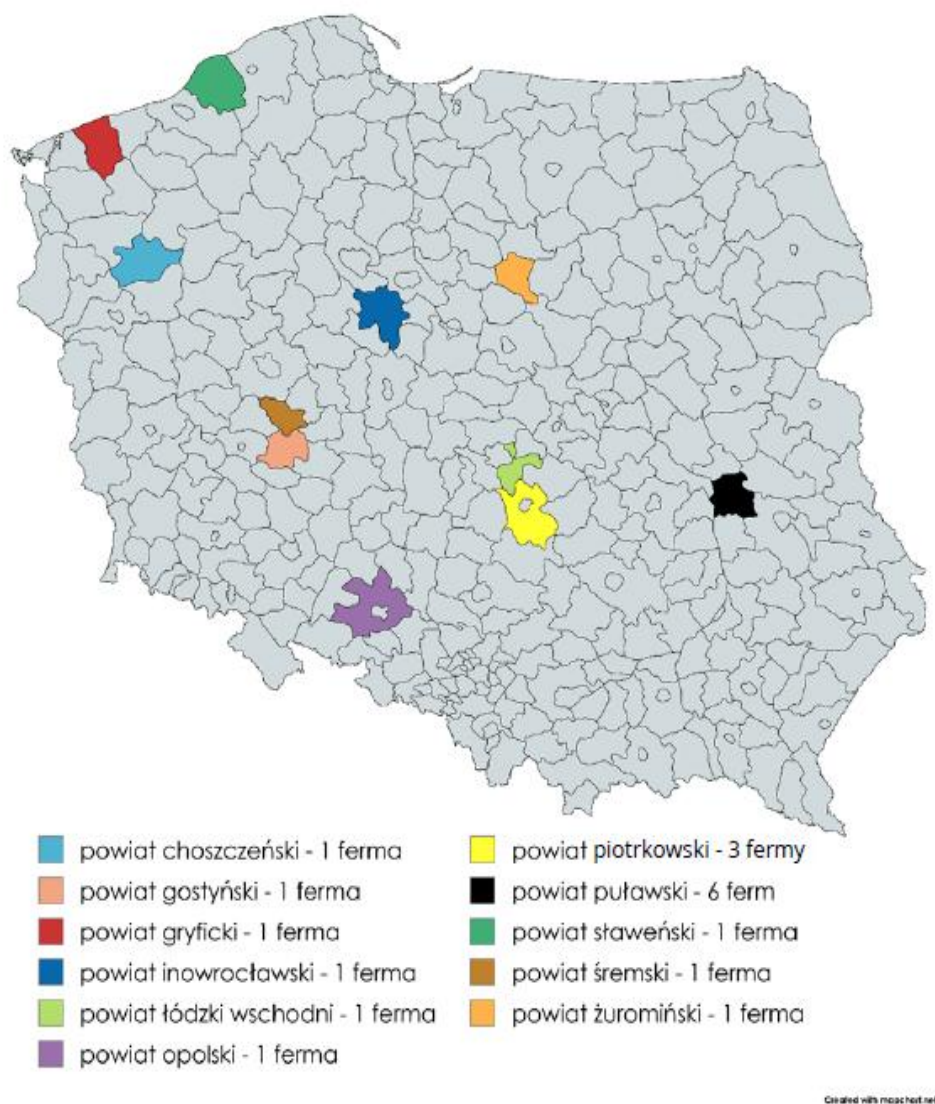
Szczegółowe cele pracy obejmowały następujące elementy:

1. Ocenę przydatności TOPF w diagnostyce oraz monitorowaniu zakażeń PRRSV i PCV2 u świń z wykorzystaniem komercyjnych testów diagnostycznych dedykowanych do innych rodzajów próbek.
2. Analizę wpływu pulowania próbek TOPF na zdolność komercyjnych testów diagnostycznych do prawidłowej klasyfikacji próbek w badaniach ukierunkowanych na wykrywanie swoistych przeciwciał.
3. Analizę wpływu pulowania próbek TOPF na zdolność komercyjnych testów diagnostycznych do prawidłowej klasyfikacji próbek w badaniach molekularnych.
4. Analizę możliwości wykorzystania wyników uzyskanych z TOPF w ocenie statusu zdrowotnego całego miotu (knurków i loszek) w odniesieniu do badanych wirusów.

6. Materiały i metody

6.1 Próbkki

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem próbek pochodzących z 18 komercyjnych ferm trzody chlewnej zlokalizowanych w 11 powiatach na terenie kraju (rycina 1). Dwa stada zostały wcześniej zdiagnozowane jako pozytywne pod kątem PRRSV, a status pozostałych był nieznany. W czterech z tych ferm nie wykonywano szczepień przeciwko PRRSV. We wszystkich fermach wykonywano szczepienia przeciwko PCV2, z wyjątkiem jednego gospodarstwa zlokalizowanego w województwie lubelskim. We wszystkich gospodarstwach objętych badaniem, rutynowo wykonywano kastrację chirurgiczną oraz prowadzono serologiczny monitoring stanu zdrowia zwierząt. Próbkki wykorzystane w badaniach były pobierane z żyły szyjnej zewnętrznej lub żyły jarzmowej do probówek do pozyskiwania surowicy krwi do badań z aktywatorem krzepnięcia (MLVacuCol®, MEDLAB, Raszyn, Polska), przez lekarzy weterynarii opiekujących się stadem, w ramach rutynowych działań lekarsko-weterynaryjnych i praktyk hodowlanych, co znosi konieczność ubiegania się o zgodę Lokalnej Komisji Etycznej (Uchwała nr 67/2020 z dnia 18.12.2020). W badaniach wykorzystano próbkki (surowica, TOPF) pochodzące od 703 prosiąt (342 loszki i 361 knurków) w wieku 3–5 dni, z 62 miotów (od 1 do 15 miotów na stado). Jądra od poszczególnych knurków pobierano do probówek typu Falcon o pojemności 50 ml (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA). Wszystkie próbkki transportowano do laboratorium w opakowaniach z wkładami chłodzącymi w temperaturze około 4°C. Krew wirowano przy $2500 \times g$ przez 15 min w temperaturze 4°C, aby uzyskać surowicę. Aby uzyskać odpowiednią objętość TOPF, jądra zamrożono i rozmrożono dwukrotnie. Surowice i TOPF przechowywano zamrożone w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.



Ryc. 1. Rozmieszczenie geograficzne gospodarstw ujętych w badaniu.

6.2 Wykrywanie przeciwciał przeciwko PRRSV i symulacja pulowania

Przebadano 312 par surowic i TOPF knurków oraz 263 surowice loszek pod kątem obecności IgG swoistych dla PRRSV, wykorzystując komercyjny zestaw ELISA (PRRS Ab 4.0; Bionote, Hwasung, Republika Korei Południowej), zgodnie z zaleceniami producenta opracowanymi do badania surowicy. Próbkę i kontrole rozcieńczano w stosunku 1:39, dodając 10 µl materiału do 390 µl rozcieńczalnika. Na płytkę opłaszczoną rekombinowanymi antygenami PRRSV наносzono po 100 µl przygotowanych rozcieńczeń: kontroli pozytywnej, kontroli negatywnej oraz każdej próbki. Płytkę inkubowano 30 ± 1 minut w 18–25 °C pod folią uszczelniającą. Następnie płukano 5-krotnie, każdorazowo dodając ok. 350 µl rozcieńzonego buforu płuczającego i usuwając

go poprzez dokładne energiczne strząsanie płytki na podłożu chłonnym; nie dopuszczano do wyschnięcia dołków między następującymi po sobie etapami. Po dodaniu 100 µl koniugatu enzymatycznego inkubowano 30 ± 1 minut w 18–25 °C, ponownie płukano 5-krotnie, następnie dodawano 100 µl 3,3',5,5'-tetrametylobenzydiny (ang. 3,3',5,5'-*tetramethylbenzidine*, TMB) i inkubowano 15 minut (18–25 °C, w ciemności). Reakcję zatrzymywano, dodając 100 µl roztworu stopu. Gęstość optyczną (ang. *optical density*, OD) mierzono przy długości fali 450 nm z referencją 620 nm w czytniku mikropłytek Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Szwajcaria) bezpośrednio po zatrzymaniu reakcji. Stosunek sygnału próby do sygnału kontroli pozytywnej (ang. *sample to positive control ratio*, S/P) obliczono przy użyciu następujących równań:

$$S/P = \frac{OD_{sample} - OD_{NCx}}{OD_{PCx} - OD_{NCx}}$$

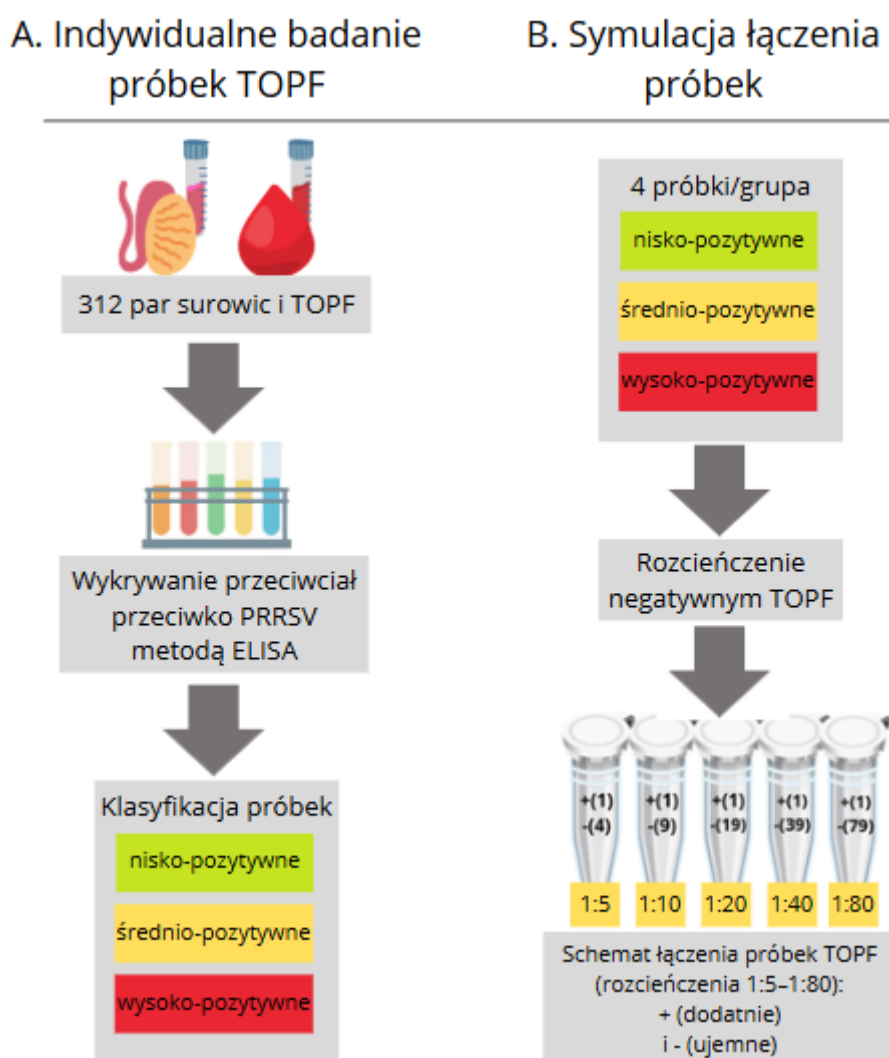
$$OD_{NCx} = \frac{OD_{NC1} + OD_{NC2}}{2}$$

$$OD_{PCx} = \frac{OD_{PC1} + OD_{PC2}}{2}$$

gdzie OD_{sample} to OD próbki, a OD_{NCx} i OD_{PCx} to odpowiednio OD średniej kontroli negatywnej i OD średniej kontroli pozytywnej. Próbka była uznawana za pozytywną dla przeciwciał przeciwko PRRSV, jeśli stosunek S/P był większy lub równy 0,4 i była uznawana za negatywną, jeśli stosunek S/P był mniejszy niż 0,4.

Biorąc pod uwagę, iż zastosowany test został opracowany i zwalidowany dla próbek innych niż TOPF w ramach badań wyznaczono optymalny punkt odcięcia dla próbek TOPF z zastosowaniem analizy krzywej charakterystyki operacyjnej odbiornika (ang. *Receiver Operating Characteristic*, ROC).

Aby ocenić wpływ pulowania próbek TOPF o różnej pozytywności na wyniki uzyskane w teście ELISA, indywidualne próbki TOPF na potrzeby zaplanowanych analiz sklasyfikowano jako nisko-, średnio- i wysoko-pozytywne (zakresy S/P odpowiednio: 0,40–1,13, 1,14–1,86 i 1,87–2,60). Dla każdego zakresu do dalszych analiz losowo wybrano po cztery próbki. Następnie 10 µl TOPF (z grup próbek nisko-, średnio- i wysoko-pozytywnych) połączono z odpowiednimi objętościami negatywnych próbek TOPF w celu symulacji pulowania 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 i 1:80. Każda z uzyskanych w ten sposób próbek zbiorczych zawierała odpowiednio 1 pozytywną i 4, 9, 19, 39 i 79 negatywnych próbek (rycina 2). Próbkę zbiorczą zostały następnie zbadane serologicznie w sposób opisany powyżej.



Ryc. 2. Schemat rozcieńczania PRRSV-pozytywnych próbek TOPF do badania metodą ELISA.

6.3 Wykrywanie przeciwciał przeciwko PCV2 i symulacja pulowania

Do badania 358 próbek surowic knurków i odpowiadających im próbek TOPF, a także 334 próbki surowic loszek, wykorzystano komercyjny zestaw ELISA - Ingezim Circo IgG 11.PCV.K1 (Ingenasa, Madryt, Hiszpania), który wg instrukcji jest przeznaczony do badania próbek surowicy. Dołki płytki były opłaskane rekombinowanym białkiem cirkowirusa świń. Surowice rozcieńczano 1:200 w dostarczonym buforze, po czym наносono po 100 µl do wyznaczonych dołek. Równolegle aplikowano po 100 µl surowic kontrolnych: pozytywnej i negatywnej, każdą w duplikacie. Płytkę przykrywano folią ochronną i inkubowano 1 godzinę w temperaturze 18–25 °C. Następnie płukano 4-krotnie rozcieńczonym buforem płuczącym (300 µl buforu płuczącego na dołek), opróżniano dołki i usuwano nadmiar buforu płuczącego z płytki poprzez dokładne jej opukiwanie na podłożu chłonnym. Nie dopuszczano do wyschnięcia dołek między następującymi po sobie etapami. Następnie dodawano 100 µl koniugatu enzymatycznego, inkubowano 30 minut w temperaturze 18–25 °C i płukano buforem 6-krotnie jak wyżej. Do każdego dołka dodawano 100 µl TMB, inkubowano 10 minut w temperaturze 18–25 °C, po czym dodawano 100 µl roztworu stopu. OD mierzono przy długości fali równej 450 nm z referencyjną długością fali 620 nm przy użyciu czytnika mikropłytek Infinite® 200 PRO (Tecan, Männedorf, Szwajcaria) bezpośrednio po zatrzymaniu reakcji.

Punkt odcięcia (wartość graniczną pozytywną testu) dla każdej płytki obliczano przy pomocy poniższych równań:

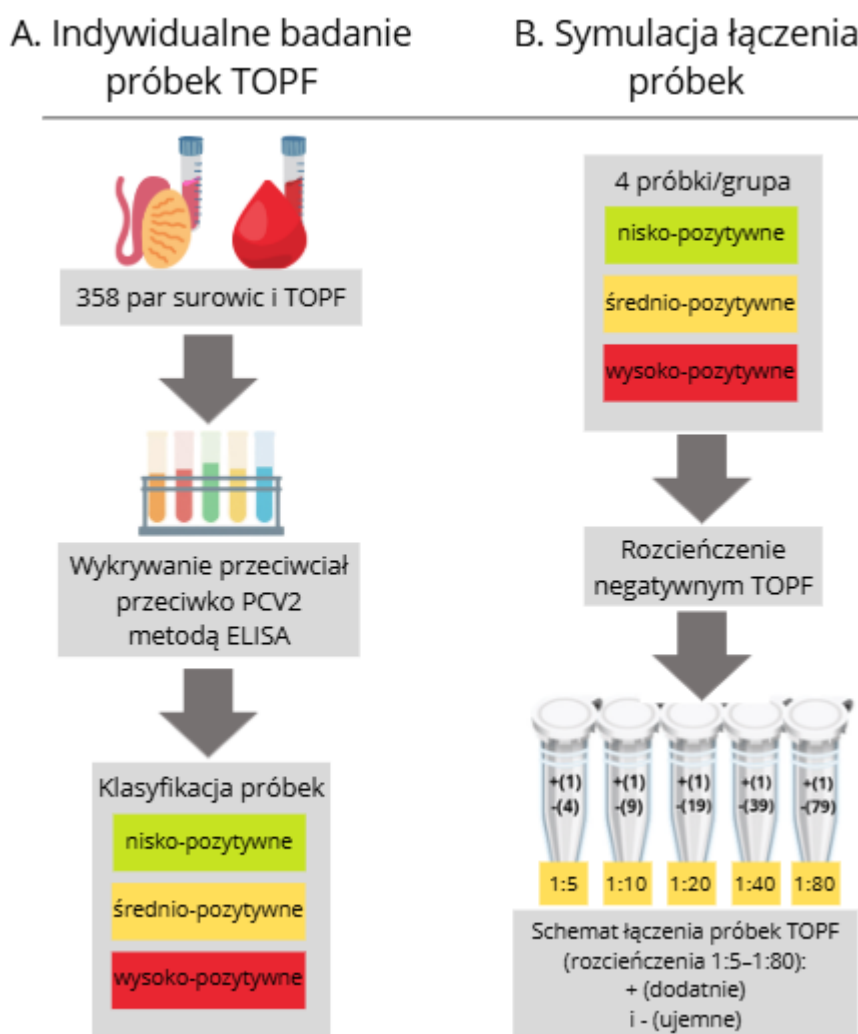
$$OD_{NCx} = \frac{OD_{NC1} + OD_{NC2}}{2}$$

$$\text{Cut-off}^+ = OD_{NCx} + 0,25$$

gdzie OD_{NCx} to średnia wartość OD kontroli negatywnej na danej płytce, a Cut-off^+ to pozytywna wartość graniczna testu wyznaczana osobno dla każdej płytki. Po wyliczeniu wartości granicznej oddzielnie dla każdej płytki ELISA, obliczono także średnią wartość graniczną ze wszystkich płytek. Uśrednienie to zastosowano w dalszych analizach statystycznych, co pozwoliło na ujednolicenie interpretacji wyników.

Biorąc pod uwagę, iż zastosowany test został opracowany i zwalidowany dla próbek innych niż TOPF w ramach badań wyznaczono optymalny punkt odcięcia dla próbek TOPF z zastosowaniem analizy krzywych ROC.

Aby ocenić wpływ pulowania próbek TOPF o różnej pozytywności na wyniki uzyskane w teście ELISA, indywidualne próbki TOPF sklasyfikowano jako nisko-, średnio- i wysoko-pozytywne (zakresy OD odpowiednio: 0,30–1,00; 1,01–2,00; 2,01–3,76). Dla każdego zakresu do dalszych analiz losowo wybrano po cztery próbki. Następnie 10 µl TOPF (z grup próbek nisko-, średnio- i wysoko-pozytywnych) połączono z odpowiednimi objętościami negatywnych próbek TOPF w celu symulacji pulowania 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 i 1:80. Każda z uzyskanych w ten sposób próbek zbiorczych zawierała odpowiednio 1 pozytywną i 4, 9, 19, 39 i 79 negatywnych próbek (rycina 3). Próbkę zbiorczą zostały następnie zbadane serologicznie w sposób opisany powyżej.



Ryc. 3. Schemat rozcieńczania PCV2-pozytywnych próbek TOPF do badania metodą ELISA.

6.4 Wykrywanie materiału genetycznego PRRSV i symulacja pulowania

Do analiz wykorzystano 348 par surowic i TOPF od knurków oraz 341 surowic loszek. Materiał genetyczny wirusa z badanych próbek izolowano przy użyciu komercyjnego zestawu Viral DNA/RNA (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) zgodnie z instrukcją producenta. Do 100 µl odwirowanej wcześniej surowicy lub TOPF dodawano 400 µl roztworu litycznego (R9F), intensywnie mieszano przez 10 sekund i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 18–25°C. Następnie do mieszaniny dodawano 250 µl izopropanolu, probówkę zamykano i kilkakrotnie odwracano w celu dokładnego wymieszania. Całość nanoszono na minikolumnę i wirowano przez 1 minutę z prędkością 14 000 obrotów na minutę. Minikolumnę przenoszono do nowej probówki o objętości 2 ml, dodawano 700 µl buforu płuczącego (A1) i wirowano 1 minutę przy 14 000 obrotach na minutę. Kolumnę przenoszono do kolejnej probówki 2 ml, ponownie dodawano 700 µl buforu płuczącego i wirowano 1 minutę z tą samą prędkością. Filtrat odrzucano, minikolumnę odkładano do tej samej probówki, dodawano 300 µl buforu płuczącego i wirowano 2 minuty przy 14 000 obrotach na minutę w celu osuszenia złoza. Minikolumnę przenoszono do jałowej probówki o objętości 1,5 ml. Na złoże minikolumny nanoszono 60 µl czystej wody, inkubowano 3 minuty w temperaturze 18–25°C, a następnie eluowano kwasy nukleinowe przez wirowanie 1 minutę przy 14 000 obrotach na minutę. Minikolumnę usuwano, a oczyszczone RNA przechowywano w temperaturze –80°C do czasu dalszych analiz.

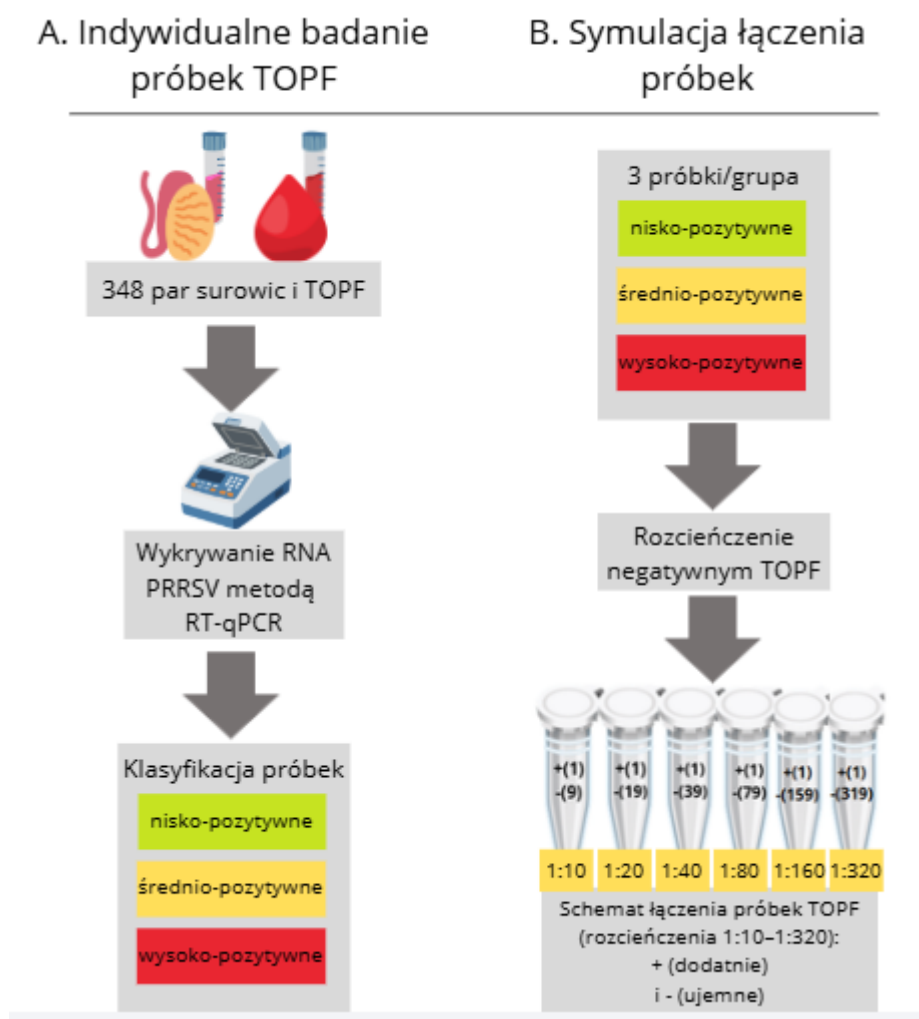
Do wykrywania RNA PRRSV użyto komercyjnego zestawu ViroReal Kit PRRSV Type 1 & 2 (Ingenetix, Wiedeń, Austria) dedykowanego do wykrywania materiału genetycznego PRRSV-1 i PRRSV-2. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano na lodzie. Dla każdej reakcji przygotowywano 10 µl tzw. „master mix”, zawierającego: 2 µl wody wolnej od nukleaz, 5 µl mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji i PCR, 1 µl mieszaniny starterów i sond specyficznych dla PRRSV 1 i 2 oraz 1 µl mieszaniny reakcyjnej wewnętrznej kontroli pozytywnej RNA oraz 1,0 µl docelowego RNA dla wewnętrznej kontroli pozytywnej. Do tak przygotowanego „master mixu” dodawano 10 µl próbki RNA, uzyskując 20 µl całkowitej objętości reakcji. Amplifikację prowadzono w następujących warunkach: wstępna inkubacja 50°C przez 15 minut, następnie denaturacja w 95°C przez 20 sekund; dalej 45 cykli składających się z etapu denaturacji (95°C przez 5 sekund) oraz przyłączania starterów i wydłużania (60°C przez 1 minutę). Sygnał fluorescencji rejestrowano w kanałach: FAM – detekcja PRRSV-1, VIC/HEX –

PRRSV-2, Cy5 – detekcja wewnętrznej kontroli pozytywnej RNA; jako barwnika referencyjnego używano ROX. Reakcję uznawano za prawidłowo przeprowadzoną, gdy: (i) kontrola negatywna reakcji nie wykazywała sygnału w żadnym kanale; (ii) kontrola pozytywna dawała wartości Ct w przedziale 23–26 w kanale FAM (PRRSV-1) oraz 23–26 w kanale VIC/HEX (PRRSV-2), a wewnętrzna kontrola pozytywna wykazywała prawidłowy sygnał (Ct 26–29 w kanale Cy5). Próbkę klasyfikowano jako pozytywną w kierunku PRRSV-1, gdy sygnał był obecny w kanale FAM przy braku sygnału w kanale VIC/HEX; jako pozytywną w kierunku PRRSV-2, gdy sygnał był obecny w kanale VIC/HEX przy braku sygnału w kanale FAM. Zgodnie z instrukcją producenta próbkę uznawano za pozytywną, gdy Ct wynosiło ≤ 45 . Próbkę uznawano za negatywną, jeżeli Ct było > 45 lub nie obserwowano sygnału w kanałach FAM i VIC/HEX przy jednoczesnym prawidłowym sygnale wewnętrznej kontroli.

Biorąc pod uwagę, iż zastosowany test został opracowany i zwalidowany dla próbek innych niż TOPF w ramach badań przeanalizowano i w konsekwencji wyznaczono nowy optymalny punkt odcięcia dla próbek TOPF z zastosowaniem analizy krzywych ROC. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA) przeznaczonego do qPCR.

Aby ocenić wpływ pulowania próbek TOPF o różnej pozytywności na wyniki uzyskane w teście RT-qPCR, indywidualne próbki TOPF sklasyfikowano jako nisko-, średnio- lub wysoko-pozytywne, zgodnie z uzyskanymi wartościami Ct, sortując je według zakresów ≥ 35 , 25,01–34,99 i ≤ 25 . Dla każdego zakresu do dalszych analiz losowo wybrano po trzy próbki. Następnie 10 μ l TOPF (z grup próbek nisko-, średnio- i wysoko-pozytywnych) połączono z odpowiednimi objętościami negatywnych próbek TOPF w celu symulacji pulowania 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 i 1:320. Każda z uzyskanych w ten sposób próbek zbiorczych zawierała odpowiednio 1 pozytywną i 9, 19,

39, 79, 159 i 319 negatywnych próbek (rycina 4). Próbki zbiorcze zostały następnie zbadane molekularnie w sposób opisany powyżej.



Ryc. 4. Schemat rozcieńczania PRRSV-pozytywnych próbek TOPF do badania metodą RT-qPCR.

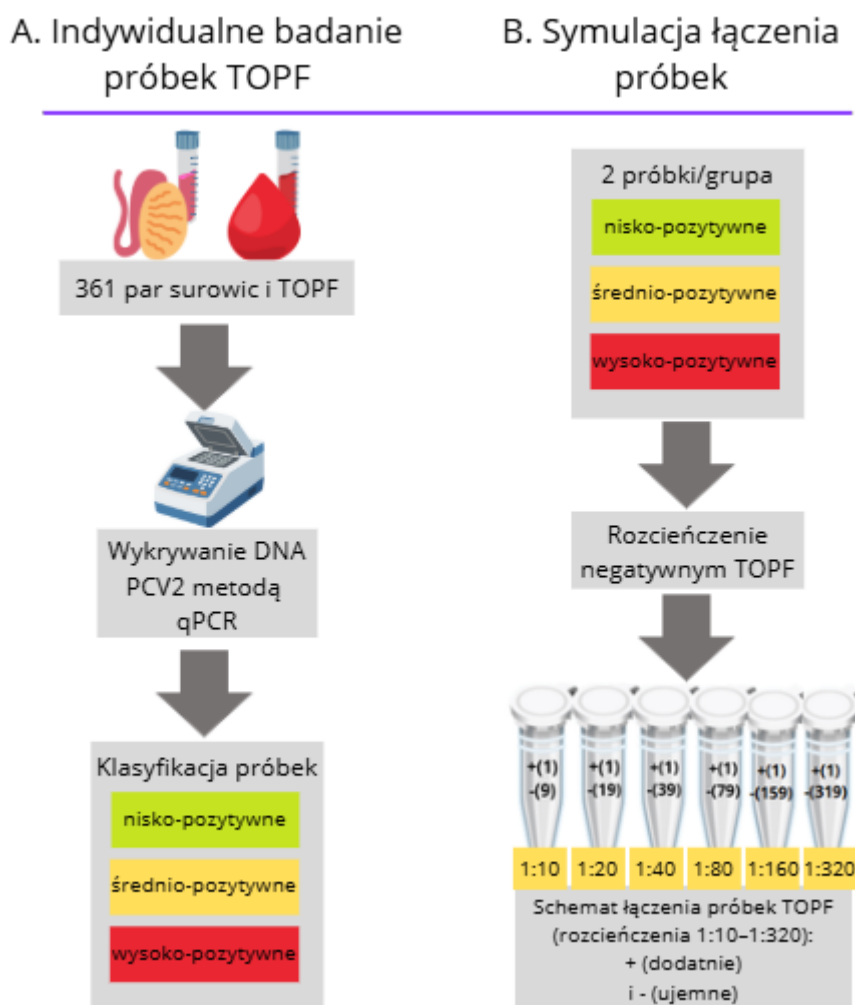
6.5 Wykrywanie materiału genetycznego PCV2 i symulacja pulowania

361 par surowic knurków i TOPF, wraz z surowicami od 242 loszek, poddano badaniu przy użyciu komercyjnego zestawu do qPCR 9ViroReal Kit PCV2 (Ingenetix GmbH, Wiedeń, Austria). Materiał genetyczny PCV2 izolowano z każdej próbki surowicy lub TOPF przy użyciu zestawu Viral DNA/RNA (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) zgodnie z instrukcją producenta i metodyką przedstawioną w pkt. 3.4. .

Wykonanie testu qPCR: Mieszaninę reakcyjną przygotowywano na lodzie. Dla każdej reakcji sporządzano „master mix” o objętości 11 µl, zawierający 10 µl buforu

reakcyjnego do PCR oraz 1 μ l mieszaniny starterów i sond dla PCV2 z wbudowaną kontrolą wewnętrzną. Do „master mixu” dodawano 9,0 μ l wyizolowanego DNA próbki, osiągając finalnie objętość 20 μ l. Amplifikację prowadzono w następujących warunkach: wstępna inkubacja 50°C przez 2 minuty, następnie denaturacja 95°C przez 2 minuty; dalej 45 cykli obejmujących denaturację w 95°C przez 5 sekund oraz przyłączanie starterów i wydłużanie w 60°C przez 60 sekund z rejestracją sygnału fluorescencji. Sygnał fluorescencyjny rejestrowano w kanałach: FAM – detekcja PCV2, Cy5 – detekcja wewnętrznej kontroli pozytywnej DNA; jako barwnika referencyjnego używano ROX. Reakcję uznawano za prawidłową, jeżeli: (i) kontrola negatywna nie wykazywała amplifikacji w żadnym kanale, (ii) kontrola pozytywna wykazywała amplifikację w kanale FAM, (iii) wewnętrzna kontrola dawała prawidłowy sygnał w kanale Cy5 (w próbkach negatywnych i w kontrolach). Próbkę klasyfikowano jako pozytywną w kierunku PCV2, gdy obserwowano sygnał w kanale FAM (niezależnie od obecności sygnału kontroli wewnętrznej). Zgodnie z instrukcją producenta, wynik uznawano za dodatni, gdy $Ct \leq 45$. Próbkę uznawano za negatywną, gdy nie obserwowano sygnału w FAM przy prawidłowym sygnale wewnętrznej kontroli w Cy5. Biorąc pod uwagę, iż zastosowany test został opracowany i zwalidowany dla próbek innych niż TOPF w ramach badań wyznaczono optymalny punkt odcięcia dla próbek TOPF (z zastosowaniem analizy krzywych ROC). Analizę przeprowadzono przy użyciu urządzenia Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornia, USA).

Aby ocenić wpływ pulowania próbek TOPF o różnej pozytywności na wyniki uzyskane w teście qPCR, indywidualne próbki TOPF sklasyfikowano jako nisko-, średnio i wysoko-pozytywne na podstawie wartości Ct (odpowiednio ≥ 36 , 30,01-35,99 i ≤ 30). Dla każdego zakresu do dalszych analiz losowo wybrano po dwie próbki. Następnie 10 μ l TOPF (z grup próbek nisko-, średnio- i wysoko-pozytywnych) połączono z odpowiednimi objętościami negatywnych próbek TOPF w celu symulacji pulowania 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 i 1:320. Każda z uzyskanych w ten sposób próbek zbiorczych zawierała odpowiednio 1 pozytywną i 9, 19, 39, 79, 159 i 319 negatywnych próbek (rycina 5). Probki zbiorcze zostały następnie zbadane molekularnie w sposób opisany powyżej.



Ryc. 5. Schemat rozcieńczania PCV2-pozytywnych próbek TOPF do badania metodą qPCR.

6.6 Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu R (wersja 4.1.2) i Microsoft Excel (wersja 2016). Wyniki uzyskane z próbek surowicy uznawano za wartości referencyjne (złoty standard). Do określenia różnic w odsetku wyników pozytywnych uzyskanych metodami ELISA lub RT-qPCR i qPCR pomiędzy surowicami knurków, loszek i TOPF zastosowano test niezależności chi-kwadrat z poprawką Bonferroniego. Dla metody wykorzystującej TOPF zamiast próbek surowicy obliczono SE, SP, wartość predykcyjną ujemną (ang. *negative predictive value*, NPV), wartość predykcyjną dodatnią (ang. *positive predictive value*, PPV) i współczynnik kappa Cohena (ang. *Cohen's kappa coefficient*, K). Do określenia optymalnej wartości odcięcia dla TOPF, zapewniającej najlepsze możliwe SE i SP (bliżej lewego górnego rogu ROC). W czterech testach komercyjnych wykorzystano analizę krzywej ROC. Krzywa ROC

została utworzona przy użyciu Statistica 13.3 (Tibco, Palo Alto, CA, USA). Poziom istotności wynosił $\alpha = 0,05$, a wartości $p < 0,05$ uznawano za statystycznie istotne. Wykresy stworzono przy pomocy programów Microsoft Excel (wersja 2016) i Canva (<https://www.canva.com/>). Mapę stworzono przy pomocy programu MapChart (<https://www.mapchart.net/>).

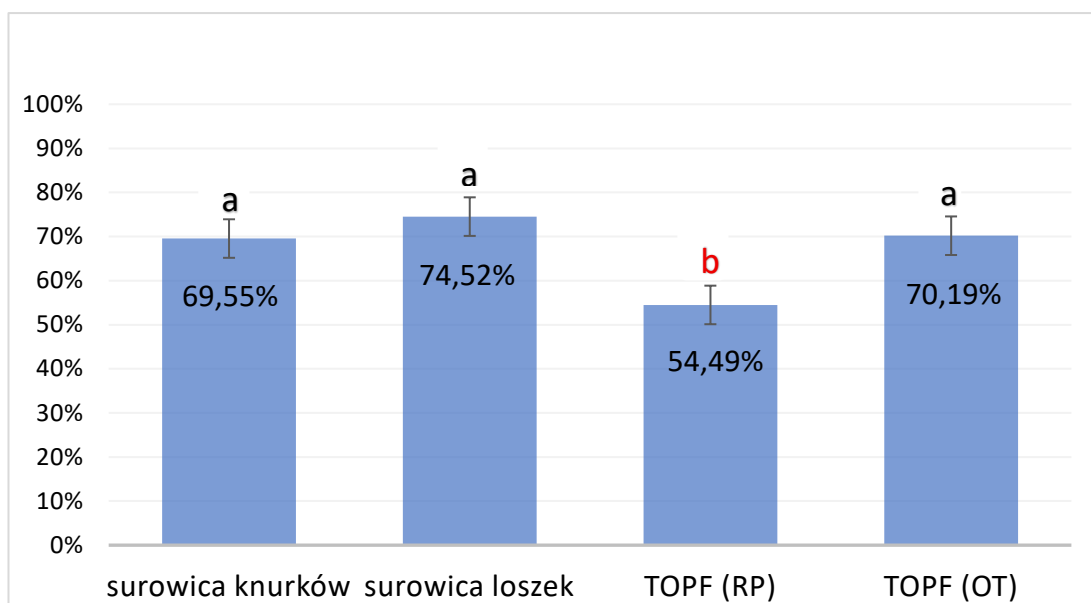
7. Wyniki

Przedstawione w poniższym rozdziale wyniki szczegółowo opisano w artykułach:

1. Turlewicz-Podbielska H., Dors A., Pomorska-Mól M. Evaluation of the utility of testicular-only processing fluid for PRRSV diagnostics and the effect of sample pooling on the test results. *Journal of Veterinary Research*, 2025, 69(1):7-16 (w dalszej części cytowany jako ARTYKUŁ 1).
2. Turlewicz-Podbielska H., Dors A., Pomorska-Mól M: Testicular processing fluid as a useful matrix for the detection of porcine circovirus type 2 DNA and virus-specific antibodies. *Frontiers in Veterinary Science*, 2026, 13:1745725 (w dalszej części cytowany jako ARTYKUŁ 2).

7.1 Wykrywanie przeciwciał przeciwko PRRSV i symulacja pulowania

Seroprewalencja PRRSV wśród badanych prosiąt wyniosła 71,83% (413/575; 95% CI: 67,96-75,47). Spośród badanych surowic samców 69,55% (217/312) było pozytywnych pod względem przeciwciał przeciwko PRRSV. Spośród odpowiadających im TOPF 54,49% (170/312) próbek dało wynik pozytywny. W przypadku surowic loszek wyniki pozytywne uzyskano w 74,52% próbek (196/263). Po zastosowaniu do interpretacji wyników punktu odcięcia rekomendowanego przez producenta testu (RP) zaobserwowano statystycznie istotne różnice w odsetku próbek pozytywnych pomiędzy surowicami knurków i TOPF ($p < 0,05$) oraz między surowicami loszek i TOPF ($p < 0,05$). Nie odnotowano istotnych różnic w odsetku pozytywnych surowic knurków i surowic loszek ($p = 0,187$) (rycina 6).



Ryc. 6. Odsetek próbek pozytywnych pod względem przeciwciał przeciwko PRRSV w poszczególnych grupach. Dla TOPF zastosowano różne punkty odcięcia (RP i OT). Wartości oznaczone różnymi literami (a, b) różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$).

Wartości minimalne, maksymalne i średnie współczynników S/P wszystkich zbadanych próbek przedstawiono w ARTYKULE 1 jako tabela 1 (*Table 1*). Stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami S/P uzyskanymi z surowic knurków i TOPF ($p < 0,05$) oraz pomiędzy wartościami uzyskanymi z surowic loszek i TOPF ($p < 0,05$); nie stwierdzono jednak różnic pomiędzy wartościami S/P uzyskanymi z surowic knurków i surowic loszek ($p = 0,235$).

Analiza krzywej ROC wykazała, że punkt odcięcia dla próbek TOPF wynoszący 0,1 S/P pozwoli na uzyskanie wyników najbardziej zbliżonych do tych uzyskanych dla próbek surowicy, stanowiących materiał referencyjny w tym badaniu (tzw. złoty standard) i powinien być uznany za optymalny punkt odcięcia (ang. *optimal threshold*, OT) dla TOPF. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA w kierunku PRRSV uzyskanych dla surowicy i TOPF przedstawiono na rycinie 1 (*Figure 1*) w ARTYKULE 1. Próbkę TOPF, dla której uzyskano wartości $\geq 0,1$ S/P powinny być uznane za pozytywne. Natomiast te z niższymi wartościami OT reprezentują próbki negatywne. Przy tej wartości punktu odcięcia, 219 (70,19%) próbek TOPF sklasyfikowano jako pozytywne pod kątem przeciwciał specyficznych dla PRRSV i nie zaobserwowano istotnych różnic w odsetku próbek pozytywnych między surowicami knurków, a TOPF ($p = 0,861$) oraz między surowicami loszek, a TOPF ($p = 0,248$). Dla wyznaczonego, przy pomocy analizy krzywych ROC, OT oraz zastosowanego testu ELISA określono

SE, SP, NPV, PPV i K. Szczegółowe zestawienie wymienionych parametrów walidacyjnych testu ELISA, uzyskanych dla różnych punktów odcięcia (RP i OT), przedstawiono w tabeli 2 (*Table 2*) w ARTYKULE 1. Wartości SE, NPV i K dla TOPF uległy znacznej poprawie po zastosowaniu nowego, niższego punktu odcięcia. Wyniki uzyskane w oparciu o interpretację OT cechują się największą dokładnością (ang. *accuracy*, ACC) oraz najwyższą wartością wskaźnika AUC (pole pod krzywą, ang. *area under the curve*): 96,34% (tabela 1).

Tabela 1. Wartości AUC, ACC oraz OT wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów: sS/Pref – wyniki dla surowicy; TOPFS/P – wyniki dla TOPF.

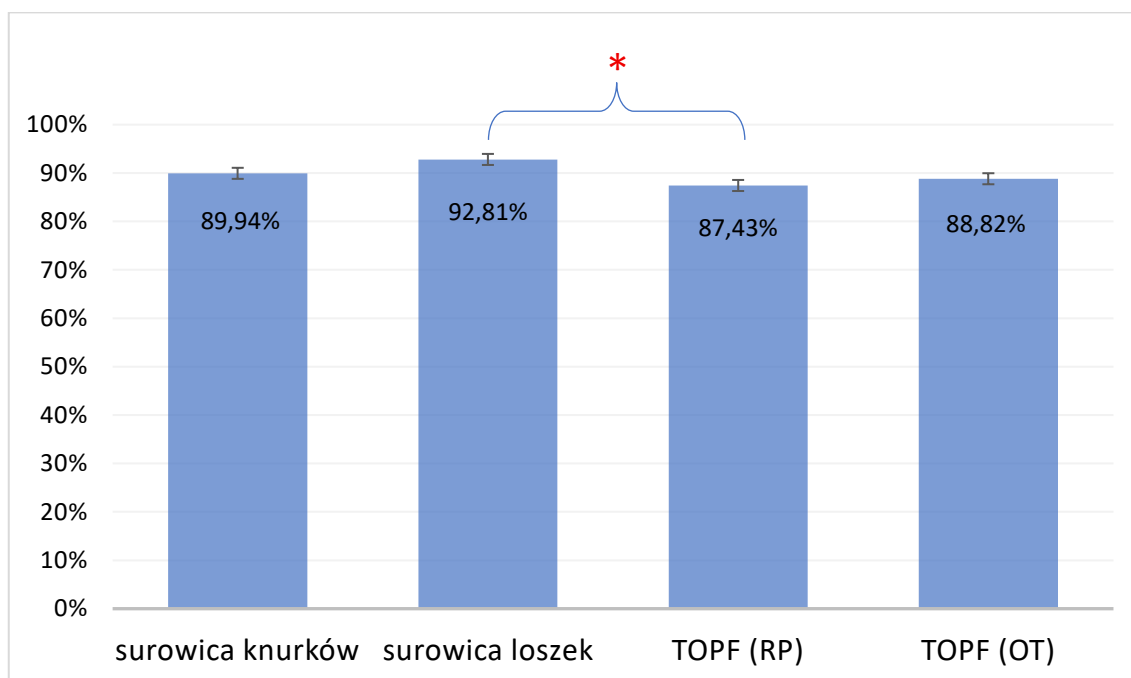
Klasyfikator	AUC	ACC	OT
sS/Pref	0,9999	0,9969	0,3540
TOPFS/P	0,9634	0,9444	0,0980

W dalszej kolejności przeanalizowano wpływ pulowania próbek TOPF na uzyskane wyniki, wykorzystując do interpretacji wyników oba punkty odcięcia, RP oraz OT. Badania umożliwiły określenie maksymalnego rozcieńczenia pozwalającego na wykrycie jednej próbki dodatniej w puli próbek ujemnych. W odniesieniu do próbek zbiorczych przygotowanych z próbek nisko-pozytywnych, przy zastosowaniu RP do interpretacji wyników nie uzyskano wyników dodatnich już przy rozcieńczeniu 1:5. Niemniej jednak, wykryto je w 20% (4/20) tych próbek po zastosowaniu OT. W pulach przygotowanych na bazie próbek średnio-pozytywnych, 35% (7/20) zostało prawidłowo sklasyfikowanych jako pozytywne przy użyciu RP, a 90% (18/20) przy użyciu OT. W próbkach zbiorczych przygotowanych z próbek wysoko-pozytywnych, odpowiednio 50% (10/20) i 100% (20/20) próbek zostało prawidłowo sklasyfikowanych jako pozytywne przy użyciu odpowiednio RP i OT. Szczegółowe wyniki dotyczące wpływu pulowania próbek TOPF na klasyfikację próbek oraz wartości S/P przedstawiono w ARTYKULE 1 jako tabela 3 (*Table 3*).

7.2 Wykrywanie przeciwciał przeciwko PCV2 i symulacja pulowania

Seroprewalencja PCV2 wśród prosiąt wyniosła 88,15% (610/652; 95% CI: 85,51-90,46). Wyniki pozytywne dla przeciwciał przeciwko PCV2 uzyskano w przypadku 89,94% (322/358) surowic samców, i 87,43% (313/358) TOPF. Wśród surowic loszek, 92,81% (310/334) próbek było pozytywnych. Zaobserwowano istotne różnice między średnimi wartościami OD surowic knurków i TOPF ($p < 0,05$) oraz między surowicami loszek i TOPF ($p < 0,05$); nie stwierdzono jednak różnic w wartościach OD uzyskanych z surowic knurków i loszek ($p = 0,101$). Minimalne, maksymalne i średnie wartości OD z badanych próbek zostały przedstawione jako tabela 1 (Table 1) ARTYKULE 2.

Po zastosowaniu RP do interpretacji wyników próbek surowicy i TOPF odnotowano istotne różnice w odsetku próbek pozytywnych między surowicami loszek i TOPF ($p < 0,05$). Nie stwierdzono istotnych różnic w odsetku próbek pozytywnych uzyskanych z surowic knurków i TOPF ($p = 0,288$) oraz między surowicami knurków i loszek ($p = 0,180$) (rycina 7).



Ryc. 7. Odsetek próbek pozytywnych pod względem przeciwciał anti-PCV2 w poszczególnych grupach. Dla TOPF zastosowano różne punkty odcięcia (RP i OT); * wartość statystycznie istotna ($p < 0,05$).

Analiza krzywej ROC wykazała, że punkt odcięcia dla próbek TOPF wynoszący 0,23 OD pozwoli na uzyskanie wyników najbardziej zbliżonych do tych uzyskanych dla próbek surowicy, stanowiących materiał referencyjny w tym badaniu (tzw. złoty standard) i powinien być uznany za OT dla TOPF. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu ELISA w kierunku PCV2 uzyskanych dla surowicy i TOPF przedstawiono na rycinie 2 (*Figure 2*) w ARTYKULE 2. Wyniki uzyskane w oparciu o interpretację OT cechują się największą ACC oraz najwyższą wartością wskaźnika AUC: 98,87% (tabela 2).

Tabela 2. Wartości AUC, ACC i OT wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów: sODref – wyniki dla surowicy; TOPFOD – wyniki dla TOPF

Klasyfikator	AUC	ACC	OT
sODref	1,0000	1,0000	0,2600
TOPFOD	0,9887	0,9693	0,2320

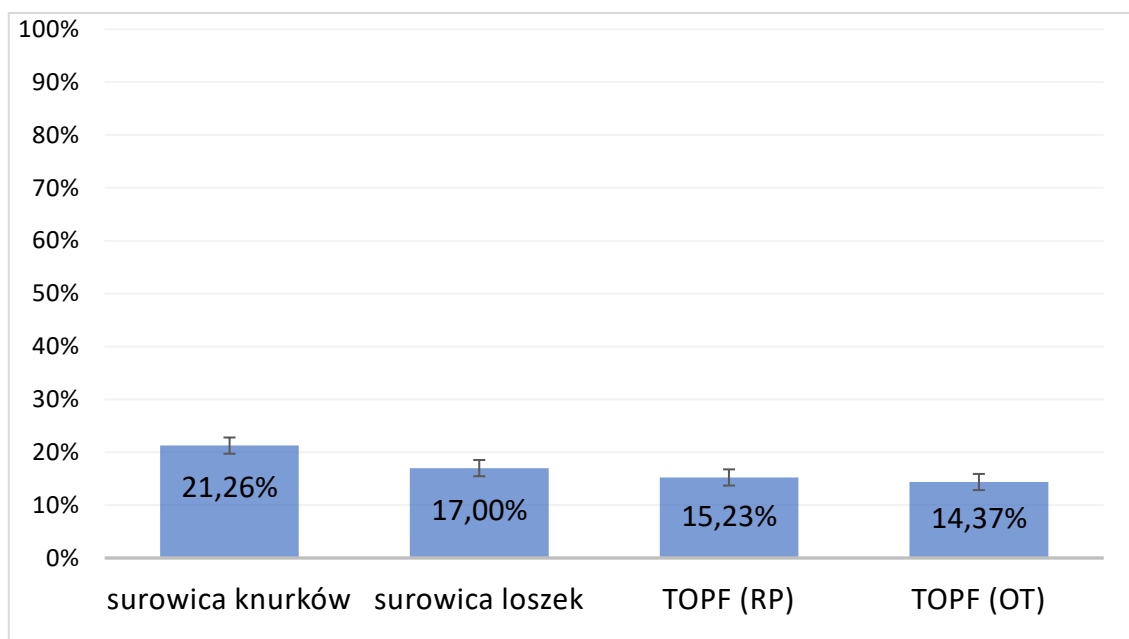
OT obliczony przy pomocy analizy ROC wyniósł 0,23 OD. Próbkę TOPF, dla których uzyskano wartości równe lub powyżej tej wartości powinny być uznane za pozytywne. Natomiast te z niższymi wartościami OT reprezentują próbki negatywne. Stosując OT, 88,82% (318/358) próbek TOPF zidentyfikowano jako pozytywne pod kątem przeciwciał specyficznych dla PCV2 i nie wykazano istotnych różnic w odsetku próbek pozytywnych między surowicami knurków a TOPF ($p = 0,627$) i między surowicami loszek a TOPF ($p = 0,070$). Po zastosowaniu do interpretacji wyników obliczonego OT poprawie uległy SE, NPV i K, jednocześnie nieznacznie obniżyły się wartości SP i PPV. Szczegółowe zestawienie wymienionych parametrów walidacyjnych testu ELISA, uzyskanych dla różnych punktów odcięcia (RP i OT), przedstawiono w tabeli 2 (*Table 2*) w ARTYKULE 2.

W dalszej kolejności oznaczono wpływ pulowania na uzyskane wyniki. W tym celu przygotowane w laboratorium próbki zbiorcze TOPF przebadano testem ELISA w celu określenia maksymalnego rozcieńczenia pozwalającego na wykrycie jednej pozytywnej próbki w puli próbek negatywnych. Stosując RP, za pozytywne uznano dwie z czterech nisko-pozytywnych próbek przy rozcieńczeniu 1:10. Po zastosowaniu OT, trzy z czterech próbek przy rozcieńczeniu 1:10 i dwie z czterech próbek przy rozcieńczeniu 1:20 zostały prawidłowo sklasyfikowane jako pozytywne. Ogólnie, 25% (5/20) i 40% (8/20) nisko-pozytywnych próbek zostało prawidłowo sklasyfikowanych jako pozytywne po

zastosowaniu odpowiednio RP i OT. Stosując RP, wszystkie średnio-pozytywne próbki zostały prawidłowo sklasyfikowane przy rozcieńczeniu 1:10, trzy z czterech próbek przy rozcieńczeniu 1:20, dwie z czterech próbek przy rozcieńczeniu 1:40 i jedna z czterech próbek przy rozcieńczeniu 1:80. Przy użyciu do interpretacji wyników OT, wszystkie średnio-pozytywne próbki zostały prawidłowo sklasyfikowane przy rozcieńczeniu 1:20, trzy z nich przy rozcieńczeniu 1:40, a jedna przy rozcieńczeniu 1:80. Łącznie, 70% (14/20) i 80% (16/20) średnio-pozytywnych próbek zostało prawidłowo sklasyfikowanych jako pozytywne po zastosowaniu odpowiednio, RP i OT. Wszystkie wysoko-pozytywne próbki zostały prawidłowo sklasyfikowane niezależnie od użytego punktu odcięcia. Szczegółowe informacje dotyczące klasyfikacji próbek i wartości OD po pulowaniu jednej objętości próbki nisko-, średnio- lub wysoko-pozytywnej TOPF z odpowiednią objętością próbek negatywnych przedstawiono ARTYKULE 2 jako tabela 4 (Table 4).

7.3 Wykrywanie materiału genetycznego PRRSV i symulacja pulowania

Prewalencja PRRSV wśród prosiąt, na podstawie analizy próbek surowicy, wyniosła 19,16% (132/689; 95% CI: 16,28-22,30). Spośród 348 przebadanych surowic samców, 21,26% (74/348) było pozytywnych pod względem RNA PRRSV. Spośród odpowiadających im TOPF 53 (15,23%) próbek dało wynik pozytywny. W przypadku surowic loszek, 17,00% (58/341) było pozytywnych. Po zastosowaniu RP do interpretacji wyników nie stwierdzono istotnych różnic w odsetku próbek pozytywnych między surowicami knurków, TOPF i surowicami loszek ($p = 0,102$) (rycina 8). Minimalne, maksymalne i średnie wartości Ct przedstawiono jako tabela 4 (Table 4) w ARTYKULE 1.



Ryc. 8. Odsetek próbek pozytywnych pod względem RNA PRRSV w poszczególnych grupach przy zastosowaniu dwóch punktów odcięcia dla TOPF.

Analiza krzywej ROC wykazała, że zastosowanie punktu odcięcia wynoszącego 43,96 Ct dla próbek TOPF pozwoli na uzyskanie wyników najbardziej zbliżonych do tych uzyskanych z surowicy, uznanej za tzw. złoty standard w niniejszych badaniach i powinno być uznane za OT dla tego rodzaju próbki. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu RT-qPCR w kierunku PRRSV uzyskanych dla surowicy i TOPF przedstawiono na rycinie 2 (*Figure 2*) w ARTYKULE 1. Wyniki uzyskane w oparciu o interpretację OT cechują się największą ACC oraz najwyższą wartością wskaźnika AUC: 83,61% (tabela 3).

Tabela 3. Wartości AUC, ACC oraz OT wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów: sCtref – wyniki dla surowicy; TOPFCt – wyniki RT-qPCR w kierunku RNA PRRSV dla TOPF.

Klasyfikator	AUC	ACC	OT
sCtref	1,0000	1,0000	45,0000
TOPFCt	0,8361	0,9310	43,9600

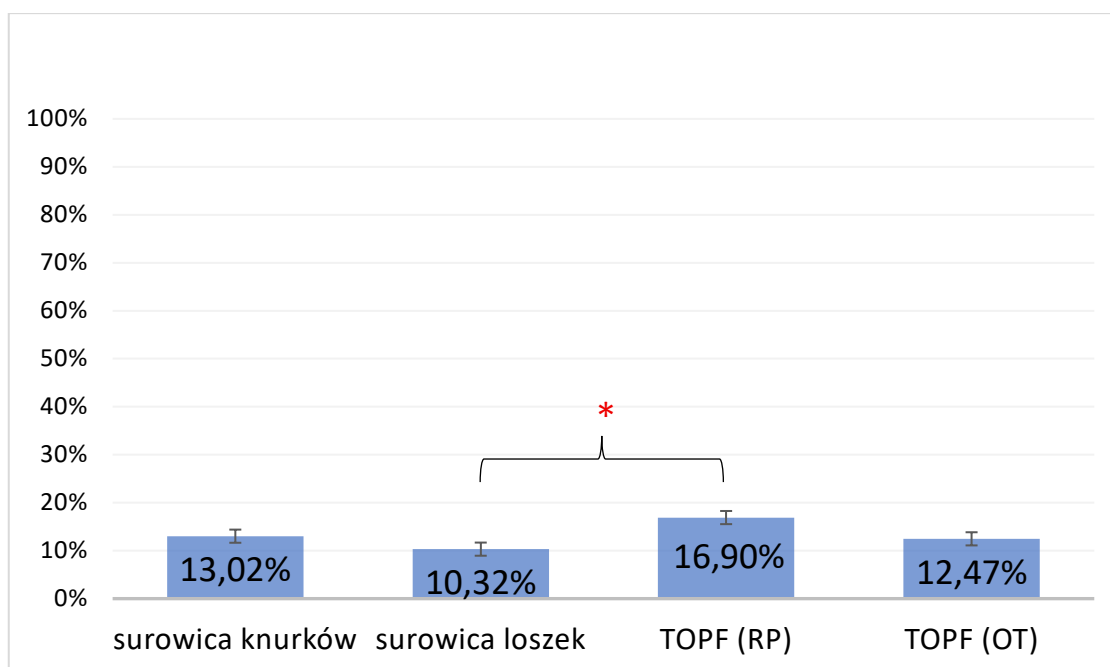
OT obliczony przy pomocy analizy ROC wyniósł 43,96 Ct. Próbki TOPF, dla których uzyskano wartości równe lub poniżej tej wartości, powinny być uznane za

pozytywne. Natomiast te z wyższymi wartościami niż OT reprezentują próbki negatywne. Analiza wyników z wykorzystaniem OT również nie ujawniła istotnych różnic w odsetku próbek pozytywnych między surowicami knurków, TOPF i surowicami loszek ($p = 0,054$) (rycina 8). Wartości SP, PPV i K dla TOPF uległy znacznej poprawie po zastosowaniu nowego, niższego OT. Jednak SE pozostała na tym samym poziomie. Szczegółowe zestawienie parametrów walidacyjnych testu RT-qPCR (SE, SP, PPV, NPV i K), uzyskanych dla różnych punktów odcięcia (RP i OT), przedstawiono w tabeli 5 (ang. *Table 5*) w ARTYKULE 1.

Następnie przygotowano próbki zbiorcze TOPF, które przebadano komercyjnymi testami diagnostycznymi w celu określenia maksymalnego rozcieńczenia pozwalającego na wykrycie jednej pozytywnej próbki w puli próbek negatywnych. W pulach przygotowanych z próbek nisko-pozytywnych wirusowe RNA wykryto tylko w 11,11% (2/18) próbek, niezależnie od zastosowanego punktu odcięcia. W pulach przygotowanych z próbek średnio-pozytywnych, 72,22% (13/18) uznano za pozytywne przy użyciu RP, a 12/18 (66,66%) przy użyciu OT. Wszystkie pule przygotowane z próbek wysoko-pozytywnych zostały prawidłowo sklasyfikowane jako pozytywne (100%; 18/18), niezależnie od użytego punktu odcięcia. Szczegółowe informacje dotyczące efektu pulowania próbek TOPF z poszczególnych kategorii (nisko-, średnio- i wysoko-pozytywnych) i ich badania komercyjnym testem RT-qPCR wykrywającym RNA PRRSV przedstawiono w ARTYKULE 1 jako tabela 6 (ang. *Table 6*).

7.4 Wykrywanie materiału genetycznego PCV2 i symulacja pulowania

Prewalencja PCV2 (materiał genetyczny) wśród prosiąt wyniosła 11,24% (79/703; 95% CI: 9,00-13,81). Spośród 361 przebadanych surowic samców, 13,02% (47/361) dało wynik dodatni w teście PCR. Spośród TOPF uzyskanych od tych samych knurków, 16,90% (61/361) próbek dało wynik pozytywny. W przypadku surowic od loszek 9,36% (32/342) próbek było pozytywnych. Używając RP, nie stwierdzono istotnych różnic w odsetku próbek pozytywnych między surowicami knurków i TOPF ($p = 0,144$) oraz surowicami knurków i surowicami loszek ($p = 0,124$). Stwierdzono natomiast istotną różnicę między odsetkiem pozytywnych surowic loszek, a TOPF ($p < 0,05$) (rycina 9). Minimalne, maksymalne i średnie wartości Ct przedstawiono w ARTYKULE 2 jako tabela 5 (ang. *Table 5*).



Ryc. 9. Odsetek próbek pozytywnych pod względem DNA PCV2 w poszczególnych grupach przy zastosowaniu dwóch punktów odcięcia dla TOPF;

* wartość statystycznie istotna ($p < 0,05$).

Analiza krzywej ROC wykazała, że dla próbek TOPF punkt odcięcia wynoszący 36,50 Ct pozwoli na uzyskanie wyników najbardziej zbliżonych do tych otrzymanych dla surowicy (złotego standardu) i powinien być uznany za OT dla tego rodzaju próbki. Przebieg krzywych ROC dla wyników testu qPCR w kierunku PCV2 uzyskanych dla surowicy i TOPF w ARTYKULE 2 jako rysunek 3 (ang. *Figure 3*). Wyniki uzyskane w oparciu o OT cechują się największą ACC oraz najwyższą wartością wskaźnika AUC: 96,86% (tabela 4).

Tabela 4. Wartości AUC, ACC oraz OT wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów: sCtref – wyniki dla surowicy; TOPFCt – wyniki qPCR w kierunku DNA PCV2 dla TOPF.

Klasyfikator	AUC	ACC	OT
sCtref	1,0000	1,0000	45,1
TOPFCt	0,9686	0,9831	36,5

Korzystając przy interpretacji wyników z wyznaczonego OT, 12,47% (45/361) próbek TOPF sklasyfikowano jako pozytywne pod kątem DNA PCV2 i nie stwierdzono

istotnych różnic w odsetku pozytywnych próbek między wynikami uzyskanymi z surowic knurków, TOPF i surowic loszek ($p = 0,267$) (rycina 9). SE, SP, PPV, NPV i K obliczone dla TOPF przy użyciu RP i OT przedstawiono w ARTYKULE 2 jako tabela 6 (ang. *Table 6*). Wartości SP, PPV, NPV i K dla TOPF poprawiły się po zastosowaniu nowego, niższego OT. SE pozostała jednak na tym samym poziomie.

Następnie, w celu określenia maksymalnego rozcieńczenia, które umożliwia wykrycie jednej pozytywnej próbki w puli próbek negatywnych, przebadano przygotowane w laboratorium próbki zbiorcze TOPF. Wirusowe DNA nie zostało wykryte w żadnej z pulowanych próbek przygotowanych z wykorzystaniem próbek nisko-pozytywnych, niezależnie od zastosowanego punktu odcięcia i rozcieńczenia. W pulach przygotowanych z próbek średnio-pozytywnych materiał genetyczny wirusa wykryto w jednej puli przy rozcieńczeniu 1:80. Ogólnie, 33,33% (4/12) i 0% (0/12) próbek zbiorczych przygotowanych ze średnio-pozytywnych TOPF zostało prawidłowo sklasyfikowanych jako pozytywne, odpowiednio przy użyciu RP i OT. Gdy do interpretacji wyników próbek zbiorczych przygotowanych z próbek wysoko-pozytywnych wykorzystano RP, DNA PCV2 wykryto we wszystkich rozcieńczeniach (100%; 12/12). Po zastosowaniu OT, materiał genetyczny wirusa był już wykrywalny tylko w dwóch próbkach przy rozcieńczeniu 1:80 i jednej przy rozcieńczeniu 1:320. Ogółem 83,33% (10/12) próbek zbiorczych z grupy wysoko-pozytywnych zostało sklasyfikowanych prawidłowo po zastosowaniu OT. Szczegółowe informacje dotyczące pulowania próbek TOPF w teście qPCR wykrywającym DNA PCV2 (w kategoriach próbek nisko-, średnio- i wysoko-pozytywnych przedstawiono w ARTYKULE 2 jako tabela 8 (ang. *Table 8*).

8. Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach skupiono się na ocenie przydatności TOPF jako matrycy do serologicznej i molekularnej diagnostyki laboratoryjnej zakażeń PRRSV i PCV2 przy wykorzystaniu komercyjnych testów diagnostycznych. Użyto dostępnych na rynku zestawów diagnostycznych, które są jednak dedykowane do innych niż TOPF rodzajów materiału biologicznego. Aktualnie brak jest na rynku zestawów dedykowanych do badania PF/TOPF. Wczesne wykrywanie oraz skuteczne monitorowanie krążenia patogenów, w tym PRRSV i PCV2 w stadach trzody chlewnej stanowi jeden z najważniejszych elementów nowoczesnych strategii profilaktyki i zwalczania chorób zakaźnych świń (VanderWaal i in., 2018; Alarcón i in., 2021). PRRSV i PCV2 są czynnikami etiologicznymi odpowiednio PRRS i PCV2-AD; biorą także udział w patogenezie innych zespołów chorobowych, wywołując immunosupresję, pogorszenie wskaźników produkcyjnych oraz zwiększoną podatność na zakażenia wtórne (Ouyang i in., 2019; Zhao i in., 2021; Fehér i in., 2023). Obecność PRRSV i PCV2 w populacji świń, nawet przy braku objawów klinicznych, może skutkować istotnymi stratami ekonomicznymi poprzez wzrost śmiertelności, obniżenie tempa wzrostu, pogorszenie wydajności rozrodu i zwiększenie kosztów leczenia (Opriessnig i in., 2007; Chand i in., 2012; Lunney i in., 2016). Kluczowym wyzwaniem dla lekarzy weterynarii pozostaje więc wybór odpowiedniej metody diagnostycznej, która zapewni nie tylko wysokie SE i SP, ale również będzie praktyczna, tania i łatwa do wdrożenia w warunkach fermowych. W tym kontekście rośnie znaczenie wdrażania metod diagnostycznych, które pozwalają nie tylko na szybkie i wiarygodne wykrycie materiału genetycznego patogenów lub swoistych przeciwciał, ale także są praktyczne do zastosowania w warunkach terenowych i nie generują dodatkowych kosztów.

TOPF, będący „produktem ubocznym” kastracji prosiąt, stanowi obiecującą, niskokosztową i łatwą do pozyskania alternatywę dla klasycznej matrycy diagnostycznej, jaką jest krew. Wykorzystanie TOPF do badań serologicznych oraz molekularnych wydaje się szczególnie zasadne w świetle faktu, że w wielu krajach, w tym w Polsce, kastracja chirurgiczna prosiąt wciąż jest powszechnie stosowana. Tym samym TOPF, może zyskać nowe znaczenie jako użyteczna próbka pozwalająca na ocenę statusu zdrowotnego świń w gospodarstwach z pełnym cyklem produkcyjnym lub odchowujących prosięta bez konieczności dodatkowego pobierania próbek i stresowania zwierząt. TOPF jako matryca diagnostyczna posiada liczne atuty: jego pobranie nie

wymaga dodatkowych zabiegów na zwierzętach, dostępność materiału jest regularna i przewidywalna, a objętość pozyskiwanego płynu pozwala na przeprowadzenie zarówno badań serologicznych (np. ELISA), jak i molekularnych (np. qPCR). Jak wykazały nasze badania, TOPF umożliwia ocenę statusu zdrowotnego całych miotów w bardzo wczesnym okresie życia – już w pierwszym tygodniu po urodzeniu – co jest istotne zwłaszcza w kontekście patogenów przenoszonych drogą wertykalną. TOPF można wykorzystać także jako uzupełnienie próbkobrania innymi metodami (np. pobieranie OF, wymazów z nosa), szczególnie w sytuacjach, gdy rutynowe pobieranie krwi jest logistycznie trudne lub niepożądane ze względów dobrostanowych.

W badaniach zastosowano komercyjne testy ELISA, pierwotnie przeznaczone do badania próbek surowicy, oraz komercyjne testy qPCR. Test RT-qPCR dedykowany do wykrywania RNA PRRSV, zgodnie z wytycznymi producenta, jest przeznaczony do wykrywania materiału genetycznego PRRSV we krwi, ślinie, nasieniu, w kale, wydzielinach z nozdrzy oraz w tkankach. Test qPCR przeznaczony do wykrywania DNA PCV2 został zwalidowany do wykrywania materiału genetycznego PCV2 w surowicy, moczu, kale i wymazach tchawiczo-oskrzelowych. Żaden z wykorzystanych komercyjnych testów serologicznych i molekularnych nie był zwalidowany do użycia z TOPF. Do analiz, oprócz surowic knurków i odpowiadających im TOPF, włączono surowice od loszek, aby sprawdzić, czy istnieją różnice między wynikami uzyskanymi z surowic samic i samców, oraz surowic samic i samców i TOPF.

W badaniach ukierunkowanych na wykrywanie przeciwciał przeciw PRRSV przy zastosowaniu do interpretacji wyników RP stwierdzono istotną różnicę w odsetku próbek pozytywnych uzyskanych z surowic prosiąt (knurków i loszek) i TOPF. Stężenie przeciwciał specyficznych dla PRRSV w TOPF pozyskanym od knurków w wieku 3–5 dni okazało się być istotnie niższe niż w ich surowicy ($p < 0,05$). Badania nad innymi płynami biologicznymi, takimi jak OF czy sok mięsny, również wskazują na istotnie niższe stężenia przeciwciał w tych matrycach w porównaniu do surowicy (De Lucia i in., 2019; Nielsen i in., 1998; Olsen i in., 2013). Zjawisko to można wyjaśnić obecnością w PF lub TOPF innych płynów (limfy i płynu wewnątrzkomórkowego) oraz pełnej krwi, które rozcieńczają przeciwciała obecne w surowicy (Di Bartolo i in., 2020; Trevisan i in., 2019; Vilalta i in., 2018). Z tego względu stosowanie testów przeznaczonych do surowicy bez wcześniejszego eksperymentalnego określenia ich przydatności może prowadzić do zwiększonej liczby wyników fałszywie ujemnych. Wcześniejsze badania wykazały, że przeciwciała klasy IgG przeciwko PRRSV mogą być wykrywane w PF (López i in., 2018;

2022), a zastosowanie zmodyfikowanego testu ELISA umożliwia ich wiarygodną detekcję przy odpowiednio dobranym punkcie odcięcia, zapewniając wysoką zdolność różnicowania wyników dodatnich i ujemnych (López i in., 2022). Wyniki badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej, ukierunkowane na wykrywanie przeciwciał przeciwko PRRSV wskazują, że dla TOPF należałoby zastosować znacznie niższy punkt odcięcia niż ten rekomendowany dla surowicy. Po zastosowaniu do interpretacji wyników OT, obliczonego metodą ROC, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odsetku wyników pozytywnych i negatywnych w surowicy knurków i loszek oraz w odpowiadającym surowicom knurków próbkach TOPF ($p \geq 0,05$). Zastosowanie OT w zakresie interpretacji TOPF znacząco poprawiło także parametry walidacyjne testu – wartość SE wzrosła z 76,95% do 86,47%, a NPV z 0,65 do 0,95. Zwiększyła się również zgodność między badanymi matrycami ($K = 0,65$ vs. $0,86$). Parametry walidacyjne metody, w której badano TOPF zamiast surowicy, wskazują, że po zastosowaniu OT znacząco zmniejszyło się prawdopodobieństwo uzyskania wyników fałszywie negatywnych bez istotnego wzrostu częstości wyników fałszywie dodatnich. Brak różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi z TOPF i surowic loszek wskazuje także na możliwość interpretacji wyników analiz TOPF w odniesieniu do całego miotu.

W warunkach terenowych PF jest najczęściej stosowany jako próbka zbiorcza. Jednak brakuje ostatecznych dowodów na wpływ takiego postępowania na wyniki badań, co uzasadnia potrzebę określenia bezpiecznych poziomów pulowania i adekwatnych punktów odcięcia dla TOPF. Jak wykazały nasze badania, ostateczny wynik uzyskany z próbek zbiorczych zależał od początkowego stężenia przeciwciał przeciwko PRRSV w próbce pozytywnej, która została rozcieńczona odpowiednią objętością próbki negatywnej oraz od zastosowanego punktu odcięcia. Gdy do interpretacji wyników zastosowano OT, liczba próbek zbiorczych zaklasyfikowanych fałszywie jako negatywne zmniejszyła się. Ponadto więcej próbek zbiorczych było prawidłowo klasyfikowanych jako pozytywne nawet w wyższych rozcieńczeniach. Rozcieńczenie 1:5 lub wyższe w przypadku próbek nisko-pozytywnych w każdym przypadku skutkowało uzyskaniem wyniku fałszywie ujemnego przy użyciu do interpretacji RP. Natomiast przy zastosowaniu OT wszystkie próbki nisko-pozytywne przy rozcieńczeniu 1:5 zostały prawidłowo sklasyfikowane. Jednak wyższe rozcieńczenia prowadziły do uzyskania wyników fałszywie ujemnych. W próbkach zbiorczych przygotowanych ze średnio-pozytywnych TOPF, przy użyciu do interpretacji RP, przeciwciała przeciwko PRRSV wykryto we wszystkich pulach przy rozcieńczeniu 1:5 oraz w trzech z czterech próbek

przy rozcieńczeniu 1:10. Po zastosowaniu OT, wszystkie próbki zbiorcze zostały prawidłowo sklasyfikowane jako pozytywne przy rozcieńczeniu do 1:40, natomiast przy rozcieńczeniu 1:80 jedynie dwie z czterech. Po zastosowaniu OT całkowity odsetek prawidłowo sklasyfikowanych, średnio-pozytywnych próbek zbiorczych wzrósł z 35% do 90%. Zastosowanie OT do interpretacji wyników próbek zbiorczych przygotowanych z próbek wysoko-pozytywnych spowodowało, że uzyskano pełną zgodność z wynikami z próbek niepulowanych, niezależnie od zastosowanego rozcieńczenia (100% prawidłowo sklasyfikowanych próbek zbiorczych przy rozcieńczeniach do 1:80). Natomiast po zastosowaniu RP, odnotowano 100% prawidłowo sklasyfikowanych próbek zbiorczych jedynie w rozcieńczeniu 1:10. Przy zastosowaniu rozcieńczenia 1:20 tylko dwie z czterech próbek zostały prawidłowo sklasyfikowane, a w wyższych rozcieńczeniach nie wykryto już przeciwciał przeciwko PRRSV. Należy mieć na uwadze, że pożądane jest, aby test ELISA był wystarczająco czuły, aby wykryć co najmniej jedno pozytywne zwierzę przy rozcieńczeniu 1:10, co odpowiada symulacji badania próbek zbiorczych pochodzących z miotów liczących około 20 prosiąt, przy założeniu że TOPF pozyskiwany jest wyłącznie od samców i że stanowią one połowę miotu. Po zastosowaniu OT pomyślnie wykryto jedną pozytywną próbkę zmieszaną z 19 negatywnymi próbkami we wszystkich pulach przygotowanych z próbek umiarkowanie- i wysoko-pozytywnych. Biorąc pod uwagę wszystkie rozcieńczane próbki (łącznie nisko-, średnio- i wysoko-pozytywne), po zastosowaniu OT prawidłowo sklasyfikowano 42 z 60 rozcieńczonych próbek, wobec jedynie 17 z 60 przy użyciu RP.

Badania dotyczące wykrywania przeciwciał przeciwko PCV2 także wykazały niższe średnie wartości OD w TOPF względem surowic prosiąt. Zaobserwowano również wyraźny kontrast w odsetku próbek pozytywnych pomiędzy surowicą loszek, a TOPF przy zastosowaniu RP. Należy mieć na uwadze, że stosowanie wyników uzyskanych z TOPF do całej grupy badanych zwierząt, w tym loszek, może prowadzić do niedokładnej oceny sytuacji epidemiologicznej w miocie/stadzie w odniesieniu do PCV2. Po obniżeniu punktu odcięcia zgodnie z wynikami analizy ROC nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w odsetku próbek pozytywnych między wynikami uzyskanymi od loszek, a tymi uzyskanymi z TOPF. Powyższe wyniki wskazują, że po wprowadzeniu odpowiednich zmian w interpretacji wyników, tj. zastosowaniu OT, analizy przeprowadzone z wykorzystaniem TOPF mogą być ekstrapolowane do oceny seroprevalencji w całej badanej grupie zwierząt (miotu/miotów), w tym loszek. Podobne zjawiska obserwowano w badaniach wykorzystujących inne alternatywne matryce

biologiczne, takie jak sok mięsny, w których wykazano możliwość wykrywania przeciwciał przeciwko PCV2 metodą ELISA i podkreślono, że stężenie przeciwciał w tego typu próbkach jest niższe niż w surowicy (Fabisiak i in. 2013). Wynika to z faktu, że stanowią one mieszaninę limfy, surowicy oraz płynu wewnątrzkomórkowego, prowadzącą do rozcieńczenia przeciwciał. W konsekwencji konieczne jest dostosowanie parametrów testu, w tym np. rozcieńczeń, w celu uzyskania wiarygodnych wyników (Nielsen i in., 1998; Davies i in., 2003; Fabisiak i in., 2013). W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej zastosowanie OT poprawiło parametry walidacyjne użytej w badaniach metody, takie jak SE, NPV i wartość K (odpowiednio 97,20% vs. 98,45%; 80,00 vs. 87,50% i 0,87 vs. 0,91), ale nieznacznie zmniejszyło SP i PPV (100,00% vs. 97,22% i 100% vs. 99,69%). Oznacza to, że po odpowiedniej modyfikacji punktu odcięcia możemy oczekiwać mniejszej liczby wyników fałszywie ujemnych, a liczba potencjalnych wyników fałszywie dodatnich uległa jedynie nieznacznemu podwyższeniu (do 2,78%). W sytuacji, gdy badania monitoringowe chcemy wykorzystać do oceny statusu epidemiologicznego stada czy badań związanych z eradykacją patogenów ze stada, minimalnie podwyższona szansa na uzyskanie wyników fałszywie dodatnich może mieć mniejsze konsekwencje niż wyniki fałszywie ujemne, które mogą wprowadzić lekarza/hodowcę w błąd co do np. zakończenia etapu uwalniania stada czy też co do posiadanego statusu zdrowotnego utrzymywanych świń (stado „fałszywie wolne”).

Po analizie wyników uzyskanych z próbek zbiorczych stwierdzono, że wynik końcowy był zależny od początkowego stężenia przeciwciał przeciwko PCV2 w próbce pozytywnej wykorzystanej do wykonania poszczególnych próbek zbiorczych oraz zastosowanego punktu odcięcia. Zastosowanie w interpretacji wyników OT spowodowało zmniejszenie liczby wyników fałszywie ujemnych w próbkach zbiorczych nisko- i średnio-pozytywnych. Wśród pul przygotowanych z próbek nisko-pozytywnych odpowiednio 25% i 40% próbek zbiorczych zostało sklasyfikowanych jako pozytywne przy zastosowaniu RP i OT. Wśród pul przygotowanych z próbek średnio-pozytywnych, 60% i 80% próbek zostało poprawnie sklasyfikowanych, przy zastosowaniu odpowiednio RP i OT. Zmiana punktu odcięcia nie miała wpływu na wyniki próbek zbiorczych przygotowanych z wysoko-pozytywnych próbek TOPF. Po zastosowaniu nowego punktu odcięcia we wszystkich pulach przygotowanych z próbek średnio- i wysoko-pozytywnych prawidłowo wykryto jedną próbkę pozytywną zmieszaną z 19 próbkami negatywnymi (rozcieńczenie 1:20). Podsumowując, 44 z 60 próbek zbiorczych zostały

poprawnie sklasyfikowane przy zastosowaniu OT, w porównaniu do 37 próbek zbiorczych przy zastosowaniu RP. Uzyskane wyniki wskazują, że niezależnie od stosowanych w terenie praktyk polegających na badaniu próbek zbiorczych uzyskanych z wielu miotów, zawsze należy wziąć pod uwagę, że wyniki uzyskane z próbek zbiorczych mogą nie odzwierciedlać dokładnie rzeczywistego stanu stada w odniesieniu do seroprewalencji PCV2. Może to mieć szczególne znaczenie w przypadku stad w początkowej lub końcowej fazie zakażenia, kiedy to w puli miotów negatywnych może zdarzyć się pojedynczy miot dodatni, który może nie zostać wykryty.

Zastosowanie niezmodyfikowanego protokołu testu ELISA przeznaczonego do badań surowicy do analizy TOPF prowadziło do błędnej interpretacji sytuacji epidemiologicznej w stadzie dotyczącej zarówno PRRSV jak i PCV2. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniej wykonanym badaniem dotyczącym TOPF, w którym zastosowano komercyjny test ELISA do wykrywania przeciwciał przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu E u prosiąt (Di Bartolo i in., 2020). Podobnie jak w naszych badaniach, zastosowanie przez Di Bartolo i in. (2020) niższego, wyliczonego przez autorów punktu odcięcia poprawiło stopień zgodności pomiędzy wynikami uzyskanymi z surowicy i TOPF oraz zwiększyło liczbę próbek zbiorczych prawidłowo zaklasyfikowanych jako pozytywne lub negatywne (Di Bartolo i in., 2020).

Kilka wcześniejszych badań podkreśliło wiarygodność PF jako próbki do diagnostyki molekularnej PRRS (López i in., 2018; 2021; Trevisan i in., 2019; Vilalta i in., 2018). Już w 2018 roku oceniono SE i SP metody wykorzystującej test RT-qPCR na pulowanych próbkach PF pochodzących z 77 miotów prosiąt. Wykazano wysoką zgodność wyników z PF i surowicy ($K = 0,81$), a także wysoką SE (87%) i SP (94%), co potwierdziło przydatność PF jako matrycy diagnostycznej (Vilalta i in., 2018). W kolejnym badaniu porównano wykrywalność RNA PRRSV w próbkach PF i pulowanych próbkach surowicy pochodzących od tej samej populacji prosiąt. Wszystkie próbki badano metodą RT-qPCR, wykazując znacznie wyższy odsetek wyników dodatnich w PF (83,3%; 10/12) niż w surowicy (15,3%; 11/72). Wyniki wykazały, że PF może charakteryzować się wyższą SE w wykrywaniu zakażeń PRRSV w porównaniu ze standardowym schematem próbkobrania opartym na surowicy (López i in. 2018). Pulowane próbki PF wykorzystano również do długoterminowego monitorowania statusu PRRSV w stadach objętych programem eliminacji wirusa. W badaniu przeprowadzonym w 29 stadach wykazano, że w 93% przypadków uzyskanie dwóch kolejnych wyników ujemnych w PF odpowiadało również ujemnym wynikom w surowicy prosiąt z tej samej

kohorty (Trevisan i in., 2019). W innym badaniu porównano przydatność diagnostyczną TOPF, PF uzyskanego wyłącznie z ogonów oraz wymazów z wymienia w wykrywaniu PRRSV, odnosząc wyniki do surowicy prosiąt. Wykazano, że TOPF charakteryzował się najlepszymi parametrami walidacyjnymi, w tym najwyższą SE (92%), podczas gdy PF z ogonów i wymazy z wymienia cechowały się istotnie niższymi SE: odpowiednio 62% i 23%. Wyniki te potwierdziły przewagę TOPF jako matrycy diagnostycznej w porównaniu z innymi materiałami pozyskiwanymi podczas zabiegów u prosiąt (Vilalta i in., 2021).

W badaniu stanowiącym przedmiot niniejszej pracy doktorskiej, skupiającym się na wykorzystaniu TOPF jako matrycy do diagnostyki PRRS, nawet przy zastosowaniu RP nie wykazano istotnych różnic w odsetku próbek pozytywnych między surowicą prosiąt (od knurów i loszek), a TOPF oraz między surowicami obu płci. Po analizie wyników RT-qPCR odnotowano bardzo wysoką SP (98,91%), umiarkowaną SE (67,57%) i wysoką zgodność między wynikami uzyskanymi z TOPF i z surowicy samców ($K = 0,74$). Po wprowadzeniu do interpretacji wyników nowego OT ($Ct < 44,96$) zauważono jednak wzrost SP (98,91 vs. 100%) i wzrost wartości współczynnika K (0,74 vs. 0,77) między badanymi matrycami (TOPF i surowicą knurków). Zastosowanie OT poprawiło także inne parametry walidacyjne metody (SP, PPV i K) wykorzystującej TOPF jako matrycę diagnostyczną w badaniach molekularnych. Niemniej jednak warto zauważyć, że SE metody była stosunkowo niska i nie zmieniała się niezależnie od wybranego punktu odcięcia. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, należy stwierdzić, że wyniki uzyskane z użyciem komercyjnego zestawu RT-qPCR i TOPF jako próbki badanej do wykrywania materiału genetycznego PRRSV należy interpretować ostrożnie. Wynika to z faktu niskiej wartości SE wyznaczonej dla metody z użyciem TOPF, niezależnie od przyjętego punktu odcięcia. Stosowanie TOPF jako matrycy diagnostycznej niesie ze sobą ryzyko niewykrycia wszystkich prosiąt PRRSV-pozytywnych, zwłaszcza tych z niskim mianem wirusa w surowicy (wyniki fałszywie negatywne). Podczas gdy wynik dodatni może być uznany za wysoce wiarygodny, ujemny wynik TOPF obarczony jest większym ryzykiem uzyskania wyniku fałszywie negatywnego. SP, NPV i PPV uzyskane w pracy doktorskiej były podobne do tych uzyskanych przez Vilalta i in. (2021). OT wyliczone przez tych autorów dla TOPF wyniosło ≥ 36 Ct. Zastosowanie bardziej rygorystycznego progu interpretacji dla TOPF w niniejszej pracy doktorskiej ($OT = 43,96$ Ct) w porównaniu z progiem rekomendowanym przez producenta ($RP = 45,00$ Ct) nieznacznie obniżyło SE metody

zastosowanej do wykrywania RNA PRRSV z 67,57% do 64,86%, przy jednoczesnym wzroście SP z 98,91% do 100,00% oraz PPV z 0,92 do 1,00, kosztem niewielkiego spadku NPV z 0,94 do 0,92. Prawdopodobne przyczyny dotyczą właściwości samego TOPF i etapu przedanalizy, w tym degradacji RNA związanej z cyklami mrożenia i rozmrażania zastosowanymi do pozyskania TOPF z próbek indywidualnych w niniejszych badaniach. Nie można też wykluczyć zanieczyszczenia krzyżowego w warunkach terenowych, jednak taki błąd zwykle zwiększa odsetek wyników fałszywie dodatnich (spadek SP), a nie zmniejsza SE. W niniejszym badaniu odnotowano jednak trzy wyniki fałszywie PRRSV-pozytywne interpretując je w odniesieniu do wyników uzyskanych z surowicy, w których uzyskano wysokie Ct w próbkach TOPF, ale nie zaobserwowano obecności wirusa w odpowiadających im próbkach surowicy. Pojawienie się takich wyników mogło być spowodowane faktem, że PRRSV może być przenoszony przez zanieczyszczone ręce obsługi fermy czy lekarza weterynarii lub sprzęt używany podczas kastracji (Lugo Mesa i in., 2024). Pomimo że wszyscy lekarze współpracujący przy badaniach zostali pouczeni co do procedury właściwego pobierania próbek (zmiana rękawiczek i narzędzi), nie można jednak z całą pewnością wykluczyć zanieczyszczenia krzyżowego w tym przypadku. Powyższe wskazuje, iż lekarze weterynarii wykonujący kastrację prosiąt powinni pamiętać o zmianie rękawiczek i sprzętu mogącego ulec kontaminacji po każdym prosięciu, chociaż może to być trudne w warunkach terenowych. Zachowanie sterylności może zapobiec jatrogennemu szerzeniu się zakażeń oraz fałszywie dodatnim wynikom i zanieczyszczeniom krzyżowym, szczególnie między poszczególnymi miotami i kojcami.

Jak wskazały wyniki uzyskane w pracy doktorskiej, rozcieńczenie próbki TOPF PRRSV-pozytywnej różnymi objętościami próbek PRRSV-negatywnych może doprowadzić do nieprawidłowej klasyfikacji próbki zbiorczej. Sposób pulowania zastosowany w niniejszych badaniach został podyktowany m.in. dostępnymi na etapie planowania badań danymi literaturowymi. López i in. (2018) odnotowali w swoich badaniach, że wśród 22 miotów z dodatnim wynikiem RT-qPCR na obecność PRRSV, 10 miotów zawierało tylko jedno prosię PRRSV-pozytywne. Opierając się na tych wynikach, w pracy zastosowano podejście metodologiczne polegające na łączeniu jednej objętości próbki PRRSV- i PCV2-pozytywnej z wieloma objętościami próbek negatywnych. Dodatkowo, należy mieć na uwadze, że ryzyko uzyskania wyników fałszywie negatywnych pod kątem obecności wirusowego materiału genetycznego zwiększa się, jeśli liczba cząstek wirusa w próbce pozytywnej jest niska. López i in.

(2020) stwierdzili, że uwzględnienie w próbce dwóch lub więcej próś wiremicznych zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia PRRSV. Łączenie próbek z wielu miotów może zatem zwiększyć szanse na poprawną klasyfikację próbek zbiorczych. Należy jednak zachować ostrożność przy tworzeniu próbek zbiorczych TOPF. W sytuacji, gdy w tworzonej puli znajdzie się materiał od wielu próś PRRSV-negatywnych, co może mieć miejsce np. w początkowej fazie zakażenia albo w końcowym etapie zwalczania, istnieje ryzyko nadmiernego rozcieńczenia TOPF i uzyskania wyniku fałszywie ujemnego. Sytuacja taka może rodzić istotne konsekwencje ekonomiczne dla hodowcy i zdrowotne dla zwierząt. W niniejszym badaniu wykazano, że użycie pulowanych próbek TOPF jako matrycy diagnostycznej, którą analizowano z zastosowaniem dostępnych na rynku testów RT-qPCR w kierunku PRRSV, skutkowało uzyskaniem suboptymalnych parametrów walidacyjnych metody. Należy jednak uwzględnić, że sposób przygotowania próbek w niniejszym badaniu mógł mieć wpływ na uzyskane wyniki. W celu uzyskania wystarczającej objętości TOPF do przeprowadzenia zarówno badań molekularnych, jak i serologicznych, indywidualne próbki jąder poddawano dwukrotnemu procesowi mrożenia i rozmrażania. W warunkach terenowych próbki zbiorcze PF/TOPF są zazwyczaj pozyskiwane bezpośrednio na fermie, bez konieczności ich wcześniejszego mrożenia, a uzyskiwana objętość płynu jest wystarczająca do przeprowadzenia analiz. Może to potencjalnie sprzyjać lepszej zachowalności RNA i tym samym zwiększać wykrywalność materiału genetycznego wirusa w próbkach zbiorczych. Wśród próbek nisko-pozytywnych RNA PRRSV wykryto jedynie w 2 z 18 przygotowanych pul (11,11%), wyłącznie przy rozcieńczeniach 1:10 oraz 1:20; wynik ten był taki sam niezależnie od zastosowanego punktu odcięcia. Spośród próbek średnio-pozytywnych tylko jedna spośród trzech wybranych próbek o najniższym Ct została prawidłowo sklasyfikowana przy rozcieńczeniach do 1:320, niezależnie od zastosowanego do interpretacji wyników punktu odcięcia. Łącznie odsetek pul przygotowanych z próbek średnio dodatnich sklasyfikowanych jako dodatnie wyniósł 72,22% (13/18) przy użyciu RP oraz 66,66% (12/18) po zastosowaniu OT. Co ciekawe, pomimo rozcieńczenia jednej próbki PRRSV-pozytywnej 319 negatywnymi próbkami, wszystkie wysoko-pozytywne próbki w tym badaniu zostały prawidłowo sklasyfikowane jako pozytywne przy użyciu obu punktów odcięcia. Wysoka dokładność w zakresie prawidłowej klasyfikacji próbki jako dodatniej zależała jednak od wyjściowej, niskiej wartości Ct w próbce PRRSV-pozytywnej przed wykonaniem rozcieńczeń odpowiednią objętością PRRSV-negatywnego TOPF. Podobne wyniki zaobserwowano w badaniu przeprowadzonym

przez Lópeza i in. (2021). Wspomniani badacze stwierdzili, że prawdopodobieństwo prawidłowej klasyfikacji próbki PF jako pozytywnej wynosiło 95%, gdy w próbce zbiorczej zawierającej materiał od 323 prosiąt z 28 miotów PRRSV-negatywnych znalazł się tylko 1 miot PRRSV-pozytywny. Wywnioskowali oni również, że w przypadku próbek PF należy ograniczyć liczbę miotów do 30 lub mniej (około 320 prosiąt), aby zapewnić 95% pewność wykrycia RNA PRRSV, nawet jeśli częstość występowania wirusa u prosiąt była bliska zeru (López i in., 2021).

Kilka badań podkreśliło wiarygodność PF do molekularnego wykrywania PCV2 (Castevens i in., 2019; Trevisan i in., 2020; Fan i in., 2023; 2025). Pierwsze badania wskazujące na przydatność PF jako matrycy do wykrywania DNA PCV2 metodą PCR u prosiąt ssących zaprezentowano na kongresie AASV w 2019 roku (Castevens i in., 2019). W kolejnych badaniach, przedstawionych rok później, wykazano na czterech fermach, że PF umożliwia klasyfikację grup prosiąt jako PCV2-pozytywne i PCV2-negatywne, przy czym wykrywalność wirusa miała charakter fluktuacyjny, a tylko jedna ferma pozostawała PCV2-ujemna przez ponad 5 tygodni. Wyniki te potwierdziły użyteczność PF w monitorowaniu statusu PCV2 u prosiąt oraz klasyfikacji grup zwierząt przed zasiedleniem chlewni (Trevisan i in., 2020). W 2023 r. Fan i in. ocenili przydatność różnych matryc biologicznych, w tym TOPF, do wykrywania DNA PCV2 na fermach trzody chlewnej w Chinach. W badaniu obejmującym 5075 próbek z 131 ferm wykazano, że TOPF charakteryzował się najwyższym odsetkiem wyników dodatnich (25,7%; 118/459) w porównaniu z surowicą (1,2%; 5/404) wymazami ustno-gardłowymi (9%; 85/944) oraz krwią pępowinową (3,0%; 40/1342) co wskazuje na wysoką przydatność tej matrycy w monitorowaniu zakażeń PCV2 u prosiąt przed odsadzeniem (Fan i in., 2023). Nowsze wyniki potwierdziły również wyższą wykrywalność cirkowirusów (PCV1 i PCV3) w TOPF w porównaniu z surowicą, co sugeruje większą SE tej matrycy (Fan i in., 2025).

W niniejszym badaniu odnotowano istotną różnicę w odsetku próbek pozytywnych w PCR między surowicą loszek, a TOPF przy zastosowaniu RP, jednak zastosowanie OT ją wyeliminowało. Zastosowany test qPCR z wykorzystaniem TOPF jako matrycy wykazał wysoką SE (87,23%) i SP (93,63%) oraz znaczną zgodność pomiędzy TOPF, a surowicą knurków ($K=0,72$). Jednakże po zastosowaniu OT ($C_t < 36,50$) zaobserwowano istotny wzrost SP (93,63% vs. 99,04%) oraz poprawę wartości K (0,72 vs. 0,90) dla metody wykorzystującej TOPF jako matrycę w teście qPCR. Zastosowanie OT wzmocniło zatem parametry walidacyjne metody

wykorzystującej TOPF jako materiał diagnostyczny (SP, PPV, NPV i K). Warto zauważyć, że SE metody pozostała niezmienną niezależnie od wybranego punktu odcięcia. Należy jednak podkreślić, że w niniejszym badaniu zastosowanie TOPF jako materiału diagnostycznego wiązało się z niższą SE w porównaniu z surowicą, co skutkowało niewykryciem części próbek dodatnich, zwłaszcza tych o wysokich wartościach Ct, odpowiadających niskiemu mianu PCV2. W związku z tym wyniki qPCR uzyskane z wykorzystaniem TOPF powinny być interpretowane ostrożnie. Co warto podkreślić, w badaniach prowadzonych w ramach pracy doktorskiej po zastosowaniu RP do interpretacji wyników TOPF, zaobserwowano 20 wyników pozytywnych knurków, u których wynik uzyskany z surowicy był ujemny. Liczba ta została zmniejszona po zastosowaniu OT, jednakże takie przypadki dalej występowały. Co ciekawe, inni badacze również częściej wykrywali obecność PCV2 w innych próbkach niż w surowicy. W badaniach Woźniak i in. (2019) DNA PCV2 częściej niż w surowicy wykrywano w OF. Naukowcy zauważyli, że obecność materiału genetycznego PCV2 w OF może wskazywać na zanieczyszczenie środowiskowe. Podobne wyniki uzyskali Nielsen i in. (2018). Autorzy pobrali 310 próbek zbiorczych surowicy i OF z dwóch stad, gdzie z każdego kojca pobierano krew od 4 do 5 świń, a w jednym kojcu przebywało od 5 do 33 świń. W pierwszym stadzie 80% pul surowicy i 86% próbek OF było pozytywnych w kierunku materiału genetycznego PCV2. W drugim stadzie 91% próbek zbiorczych surowicy i 100% próbek OF było pozytywnych. W obu stadach stwierdzano także wyższe miano wirusa w OF niż w próbkach zbiorczych surowic (średnia różnica: 2,10 i 1,83 $\log_{10}$ kopii PCV2 na ml). Według autorów, nieco większy odsetek pozytywnych próbek OF w porównaniu z odsetkiem próbek surowicy może wynikać z zanieczyszczenia sznura służącego do pobierania OF materiałem genetycznym PCV2 obecnym w kale. Co więcej, prawdopodobieństwo uzyskania wyniku pozytywnego może być wyższe, gdy bada się więcej zwierząt (4 lub 5 świń w przypadku pobierania krwi vs. do 33 świń współtworzących próbkę OF) (Nielsen i in., 2018). Igriczi i in. (2022) przeprowadzili badania nad wykrywaniem PCV3, należącego podobnie jak PCV2 do rodziny *Circoviridae*. Badacze zaobserwowali wyższy odsetek próbek pozytywnych wśród próbek PF niż w surowicy. Odsetek próbek PF pozytywnych pod względem PCV3 wynosił 61% (59/97). Odsetek próbek pozytywnych był niższy w przypadku OF – PCV3 wykryto w 40% (71/176) próbek. Z kolei najniższy odsetek próbek pozytywnych pod względem PCV3 odnotowano w próbkach zbiorczych surowicy (23%; 85/371). Co więcej, wartości Ct próbek PF były istotnie niższe niż w pozostałych dwóch matrycach

diagnostycznych w porównaniu do surowicy – średnia wartość wynosiła 30,18 (Igriczi i in., 2022). Sugeruje to wyższe miana cirkowirusów w tych próbkach. Należy mieć jednak na uwadze, że wspomniane badanie dotyczyło innego typu cirkowirusa świń, a próbki PF pobierano od dużej grupy zwierząt – pula pochodząca od około 10 miotów. W badaniach stanowiących przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej analizowano indywidualne próbki TOPF. Z kolei Eddicks i in. (2022) wykazali wysoki odsetek próbek PCV2- pozytywnych w tkankach (węzły chłonne pachwinowe, śledziona, grasica, płuca, mięsień sercowy) pozyskanych od martwych prosiąt przygniecionych przez maciory – 61,6% z 185 prosiąt z 134 miotów było pozytywnych pod kątem DNA PCV2. Ten sam zespół badawczy we wcześniejszych badaniach nie wykrył DNA PCV2 w żadnej z próbek surowicy prosiąt pobieranej przed i po pobraniu siary. Wszystkie 590 próbek krwi przed pobraniem siary i 581 po pobraniu siary było negatywnych pod kątem DNA PCV2 (Eddicks i in., 2016). Takie same wyniki uzyskali Dieste-Perez i in. (2018). Żadna z 352 analizowanych próbek krwi żywourodzonych prosiąt nie dała pozytywnego wyniku w qPCR (Dieste-Perez i in., 2018). Wyniki przeprowadzonego w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Fan i in. (2023), w których potwierdzono wyższy odsetek próbek pozytywnych pod kątem materiału genetycznego PCV2 w próbkach PF od prosiąt przed odsadzeniem (25,7%; 118/459) niż w surowicy (1,2%; 5/404). Fan i in. (2023) sugerują, że duża ilość pozytywnych próbek PF wskazuje, że zakażenie następuje u prosiąt wcześniej, jeszcze przed odsadzeniem, a ryzyko chorób związanych z PCV2 jest wysokie po odsadzeniu. Według autorów, zastosowanie PF jako matrycy do wykrywania PCV2 może być nawet skuteczniejszą metodą monitorowania krążenia wirusa niż zastosowanie innych próbek (Fan i in., 2023). Dostępne dane i uzyskane przez nas wyniki potwierdzają, iż wykorzystanie PF lub TOPF może być korzystniejsze w celu weryfikacji obecności PCV2 w danym stadzie i monitorowania zakażeń u nowonarodzonych prosiąt niż badania innych rodzajów próbek pobranych przyżyciowo. Niemniej jednak biorąc pod uwagę dodatnie wyniki PF lub TOPF w kontekście obecności materiału genetycznego PCV2 u prosiąt z ujemnymi wynikami z surowicy, należy interpretować ostrożnie, dopóki nie zostaną przeprowadzone dalsze badania potwierdzające np. obecność PCV2 w tkance jąder przy braku wiremii. Zawsze należy także rozważyć możliwą kontaminację środowiskową/jatrogeną próbek TOPF.

Podczas tworzenia próbek zbiorczych i poddawania ich analizom molekularnym pod kątem obecności DNA PCV2 zaobserwowano, że wartość Ct wykorzystanej do

uzyskania puli próbki dodatniej wpływa na wynik analiz puli. Ponadto, mniejsza liczba badanych próbek zbiorczych została poprawnie zidentyfikowana jako pozytywna po zastosowaniu OT.

Powyższe może wskazywać, że w przypadku metod molekularnych, w szczególności użytego w naszych badaniach testu komercyjnego, punkt odcięcia wyznaczony na podstawie analiz próbek indywidualnych może nie być optymalny dla próbek zbiorczych. Najwięcej danych literaturowych dotyczących tego zagadnienia odnosi się do diagnostyki SARS-CoV-2. Volpato i in. (2021) wykazali różnice między wynikami RT-qPCR uzyskanymi z próbek badanych indywidualnie, a wynikami tych samych próbek analizowanych w puli z dziewięcioma innymi (Volpato i in., 2021). W innych badaniach potwierdzono, że zwiększanie liczby próbek w puli prowadzi do wzrostu wartości Ct w wyniku efektu rozcieńczenia oraz do obniżenia prawdopodobieństwa detekcji wirusa, szczególnie w przypadku próbek o niskim mianie (Praharaj i in., 2020; Yip i in., 2021). Wykazano również, że dostosowanie punktu odcięcia dla próbek zbiorczych może istotnie poprawić parametry diagnostyczne testu w porównaniu z zastosowaniem progu ustalonego dla próbek indywidualnych (Yip i in., 2021).

Analogiczne zależności opisano w badaniach dotyczących próbek pobranych od świń. Wykazano, że łączenie próbek wpływa na skuteczność wykrywania RNA PRRSV metodą RT-qPCR, a prawdopodobieństwo detekcji RNA wirusowego maleje wraz ze wzrostem liczby próbek negatywnych w puli (Vilalta i in., 2019; Osemeke i in., 2022). Podobną zależność zaobserwowano w monitoringu SIV, gdzie wraz ze zmniejszaniem prewalencji oraz zwiększaniem udziału próbek negatywnych w puli odnotowano spadek prawdopodobieństwa detekcji materiału genetycznego wirusa (Romagosa i in., 2012). Zjawisko to pozostaje zgodne z zasadą, że przy 10-krotnym rozcieńczeniu tej samej próbki wartość Ct wzrasta średnio o około 3,3 jednostki (Buckingham, 2019; Volpato i in., 2021). Łączenie próbek może zatem prowadzić do przesunięcia optymalnego progu odcięcia w metodach molekularnych w celu zachowania optymalnej równowagi pomiędzy SE, a SP testu, a strategia pulowania może wymagać zastosowania dla próbek pulowanych innych punktów odcięcia niż dla próbek indywidualnych.

Aktualnie w literaturze nie ma dostępnych informacji na temat wykrywalności DNA PCV2 w TOPF, biorąc pod uwagę stopień rozcieńczenia próbki. Zgodnie z cytowanym wcześniej badaniem López i in. (2021) model regresji dla próbki PF rozcieńczonej seryjnie sugeruje, że ograniczenie tworzenia próbki zbiorczej PF do

materiału pochodzącego od 30 miotów lub mniej (około 320 prosiąt) zapewni 95% poziom ufności w wykryciu RNA PRRSV, nawet przy niskiej częstości występowania wirusa wśród prosiąt. W naszym badaniu żadna pula przygotowana z próbek nisko-pozytywnych nie została poprawnie zaklasyfikowana, niezależnie od zastosowanego punktu odcięcia. W grupie pul przygotowanych z indywidualnych średnio-pozytywnych próbek TOPF odsetek poprawnie sklasyfikowanych próbek wahał się od 0% do 33%, w zależności od zastosowanego punktu odcięcia. Wśród próbek zbiorczych przygotowanych z indywidualnych wysoko-pozytywnych TOPF, odsetek próbek poprawnie zidentyfikowanych jako pozytywne wahał się od 83,33 do 100% odpowiednio dla OT i punktu odcięcia zaproponowanego przez producenta. Należy zauważyć, że większa dokładność związana była z niższymi wartościami Ct w pozytywnej, nierozcieńczonej próbce TOPF oraz że prawdopodobieństwo wykrycia materiału genetycznego PCV2 w próbce zbiorczej zawierającej jedną próbkę od prosięcia PCV2-pozytywnego maleje wraz ze wzrostem rozcieńczenia. Podobnie jak w przypadku wyników serologicznych, testy molekularne wykonywane z użyciem pulowanych próbek TOPF nie dostarczają wiarygodnych informacji dotyczących sytuacji epidemiologicznej PCV2 w danym stadzie.

9. Podsumowanie

Przeprowadzone badania pozwoliły na realizację wszystkich założonych celów niniejszej pracy doktorskiej. W odniesieniu do pierwszego celu wykazano, że próbki TOPF mogą stanowić wartościową matrycę w diagnostyce oraz monitorowaniu zakażeń PRRSV i PCV2 u prosiąt (knurków i loszek) z wykorzystaniem komercyjnych testów zastosowanych w niniejszym badaniu. Oznaczanie przeciwciał anty-PRRSV i anty-PCV2 oraz materiału genetycznego obu wirusów w TOPF umożliwia szybką i ekonomiczną ocenę sytuacji epizootycznej w stadzie bez konieczności pobierania dodatkowych próbek. Jednocześnie parametry walidacyjne badań molekularnych ukierunkowanych na wykrywanie PRRSV wykazały ograniczoną SE, niezależnie od zastosowanego punktu odcięcia, co wymaga ostrożnej interpretacji wyników i uwzględnienia ryzyka wyników fałszywie negatywnych, szczególnie w przypadku próbek o wysokich wartościach Ct. Należy także brać pod uwagę możliwość wyników fałszywie pozytywnych związanych z potencjalną kontaminacją podczas kastracji. Analogiczna ostrożność jest wskazana w przypadku badań molekularnych TOPF w kierunku PCV2. W celu poprawy większości parametrów walidacyjnych testu qPCR, opracowanego pierwotnie dla surowicy, zasadne jest zastosowanie innego punktu odcięcia przy analizie TOPF oraz rozważenie zastosowania innych wartości punktów odcięcia dla próbek indywidualnych i pulowanych.

Realizacja drugiego celu wykazała, że pulowanie próbek TOPF w badaniach serologicznych wpływa na uzyskane wyniki i może prowadzić do obniżenia SE wykrywania przeciwciał, szczególnie w przypadku niskich mian. Odpowiednie dostosowanie punktu odcięcia pozwala jednak na poprawę parametrów walidacyjnych i ograniczenie ryzyka wyników fałszywie ujemnych. Jednocześnie wyniki uzyskane z próbek zbiorczych w testach ELISA mogą nie w pełni odzwierciedlać rzeczywisty status stada w odniesieniu do PRRSV i PCV2, zwłaszcza gdy w puli obecne są próbki o niskim mianie przeciwciał.

W odniesieniu do trzeciego celu stwierdzono, że wykorzystanie w badaniach molekularnych pulowanych próbek TOP może wpływać na uzyskane wyniki analiz laboratoryjnych, w tym prowadzić do błędnej klasyfikacji próbek zbiorczych jako dodatnie lub ujemne. Wraz ze wzrostem liczby próbek negatywnych w puli obserwowano spadek SE wykrywania materiału genetycznego, szczególnie w przypadku próbek o wysokich wartościach Ct (niskim mianie wirusa). Wyniki te potwierdzają, że efekt

rozcieńczenia może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych oraz wskazują na zasadność korekty punktów odcięcia dla próbek zbiorczych.

W ramach realizacji czwartego celu wykazano brak istotnych różnic w odsetku próbek dodatnich między surowicami prosiąt obu płci oraz między surowicami knurków i loszek oraz TOPF (przy czym w większości analiz wymagało to zastosowania zoptymalizowanego punktu odcięcia), co sugeruje możliwość wykorzystania tej matrycy do oceny statusu epidemiologicznego całego miotu, złożonego z knurków jak i loszek.

Jednocześnie należy podkreślić ograniczenia stosowania TOPF jako materiału diagnostycznego. W badaniach serologicznych potencjalne rozcieńczenie przeciwciał obecnych w płynie przez limfę i płyn wewnątrzkomórkowy może wpływać na SE testów. W diagnostyce molekularnej istnieje ryzyko kontaminacji środowiskowej, szczególnie w warunkach terenowych. Ponadto w przypadku próbek zbiorczych, zastosowanie tej matrycy nie pozwala na określenie seroprewalencji/prewalencji tj. liczby prosiąt faktycznie dodatnich w danej próbce zbiorczej.

Wymagane są dalsze badania w odniesieniu do optymalizacji procedur, standaryzacji pobierania i przygotowania TOPF do badań oraz rozszerzenia badań nad jego wykorzystaniem w monitorowaniu innych chorób wirusowych świń. Uzyskane wyniki wskazują również na potrzebę dalszych badań nad występowaniem materiału genetycznego PCV2 w jądrach prosiąt w przypadkach braku wiremii. Obserwowana rozbieżność pomiędzy wynikami uzyskanymi z surowicy, a TOPF sugeruje możliwość utrzymywania się wirusa w tkankach przy jednoczesnym braku jego wykrywalności we krwi. Wyjaśnienie znaczenia biologicznego tego zjawiska oraz jego wpływu na interpretację wyników badań molekularnych może mieć istotne znaczenie dla optymalizacji strategii monitorowania zakażeń PCV2 w stadach świń. Pomimo wskazanych ograniczeń, uzyskane wyniki potwierdzają, że TOPF może stanowić praktyczne uzupełnienie klasycznych próbek wykorzystywanych w diagnostyce laboratoryjnej, wpisując się w potrzeby rozwoju ekonomicznych i efektywnych systemów nadzoru epizootycznego w produkcji trzody chlewnej.

10. Wnioski

1. W próbkach TOPF potwierdzono obecność swoistych przeciwciał oraz materiału genetycznego PRRSV i PCV2, co wskazuje na możliwość wykorzystania TOPF w diagnostyce i monitorowaniu zakażeń tymi patogenami.
2. Komercyjne testy ELISA mogą być użyteczne do badania TOPF pod warunkiem odpowiedniego dostosowania metodyki ich wykonania, na przykład w postaci modyfikacji punktów odcięcia dla tego rodzaju próbki.
3. Parametry walidacyjne metody wykorzystującej TOPF do badań molekularnych z zastosowaniem użytych w badaniach komercyjnych testów diagnostycznych nie zawsze w pełni korespondują z wynikami uzyskanymi z surowicy, niezależnie od przyjętego punktu odcięcia, dlatego uzyskane wyniki należy interpretować ostrożnie.
4. W odniesieniu do PCV2, aby rzetelnie zweryfikować przydatność TOPF do diagnostyki molekularnej, konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań nad występowaniem materiału genetycznego tego wirusa w jądrach, przy braku wirerii.
5. Badanie pulowanych próbek TOPF (komercyjnymi testami ELISA i PCR dedykowanymi do innych próbek) może prowadzić do niewłaściwej oceny sytuacji epidemiologicznej w stadzie, zarówno w odniesieniu do PRRSV, jak i PCV2.
6. Brak różnic między wynikami uzyskanymi z surowicy knurków i loszek oraz surowicy knurków, surowicy loszek i TOPF wskazuje na możliwość interpretacji uzyskanych wyników w odniesieniu do całego miotu.

11. Bibliografia

1. Alarcón LV, Allepuz A, Mateu E. Biosecurity in pig farms: a review. *Porc Health Manag.* 2021;7:5. doi: 10.1186/s40813-020-00181-z.
2. Almeida B, Duarte MD, Duarte A, Fagulha T, Ramos F, Luís T, Caetano I, Barros SC, dos Santos FA, Henriques AM. Comprehensive Survey of PCV2 and PCV3 in Domestic Pigs and Wild Boars Across Portugal: Prevalence, Geographical Distribution and Genetic Diversity. *Pathogens.* 2025;14:675. doi: 10.3390/pathogens14070675.
3. Bierk MD, Dee SA, Rossow KD, Collins JE, Guedes MI, Pijoan C, Molitor TW. Diagnostic investigation of chronic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a breeding herd of pigs. *Vet Rec.* 2001;148:687-690. doi: 10.1136/vr.148.22.687.
4. Bonneau M, Weiler U. Pros and Cons of Alternatives to Piglet Castration: Welfare, Boar Taint, and Other Meat Quality Traits. *Animals (Basel).* 2019;9:884. doi: 10.3390/ani9110884.
5. Brinton M, Gulyaeva A, Balasuriya UD, Dunowska M, Faaberg K, Goldberg T, Leung FCC, Nauwynck HJ, Snijder EJ, Stadejek T, Gorbalenya AE. ICTV virus taxonomy profile: Arteriviridae 2021. *J Gen Virol.* 2021;102:001632. doi: 10.1099/jgv.0.001632.
6. Buckingham L. Chapter 6: nucleic acid amplification. In: Buckingham L. *Molecular diagnostics: Fundamentals, methods, and clinical applications.* 3rd ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2019:142-178.
7. Calsamiglia M, Segalés J, Quintana J, Rosell C, Domingo M. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1848-1850. doi: 10.1128/JCM.40.5.1848-1850.2002.
8. Carasova P, Celer V, Takacova K, Trundova M, Molinkova D, Lobova D, Smola J. The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. *Res Vet Sci.* 2007;83:274-278. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.11.013.
9. Carman S, McEwen B, DeLay J, van Dreumel T, Lusi P, Cai H, Fairles J. Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). *Can Vet J.* 2006;47:761-762.

10. Castevens K, Spronk E, Garbes N, Trevisan G. Use of processing fluids to monitor sows for porcine circovirus type 2 and determine parity influence on viral detection. In: Proceedings of Orlando; 2019. Online: https://www.aasv.org/library/swineinfo/item.php?AASV/2019/086_Castevens.pdf (Dostęp: 24.04.2026).
11. Castro AM, Castro FG Jr, Budiño FE, Baldin CM, Silva SO, Brandão PE, Richtzenhain LJ. Detection of Genetic characterization of Porcine circovirus 2 (PCV2) in Brazilian wildlife boars. *Braz J Microbiol.* 2012;43(3):1022-1025. doi: 10.1590/S1517-838220120003000025.
12. Cezar G, Magalhães E, Rupasinghe K, Chandra S, Silva G, Almeida M, Crim B, Burrough E, Gauger P, Siepker C, Mainenti M, Zeller M, Fano E, Piñeyro P, Main R, Thurn M, Lages P, Corzo C, Rovira A, Naikare H, McGaughey R, Matias-Ferreira F, Retallick J, Gebhardt J, Greseth J, Kersey D, Clement T, Pillatzki A, Christopher-Hennings J, Prarat M, Johnson A, Summers D, Bowen C, Boyle J, Hendrix K, Arruda AG, Linhares D, Trevisan G. Using diagnostic data from veterinary diagnostic laboratories to unravel macroepidemiological aspects of porcine circoviruses 2 and 3 in the United States from 2002-2023. *PLoS One.* 2024;19:e0311807. doi: 10.1371/journal.pone.0311807.
13. Challacombe S, Russell MW, Hawkes JE, Bergmeier LA, Lehner T. Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys. *Immunology.* 1978;35:923-931.
14. Chand RJ, Tribble BR, Rowland RR. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Curr Opin Virol.* 2012;2:256-263. doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.002.
15. Cho H, Oh T, Suh J, Chae C. Comparison of pathogenicity of 4 porcine circovirus type 2 (PCV2) genotypes (2a, 2b, 2d, and 2e) in experimentally infected pigs. *J Vet Med Sci.* 2023;85:83-87. doi: 10.1292/jvms.22-0202.
16. Ciacci-Zanella JR, Simon NL, Pinto LS, Viancelli A, Fernandes LT, Hayashi M, Dellagostin OA, Esteves PA. Detection of Genetic characterization of Porcine circovirus 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. *Res Vet Sci.* 2009;87:157-160. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.12.001.
17. Clilverd H, Martín-Valls G, Li Y, Martín M, Cortey M, Mateu E. Infection dynamics, transmission, and evolution after an outbreak of porcine reproductive

- and respiratory syndrome virus. *Front Microbiol.* 2023;14:1109881. doi: 10.3389/fmicb.2023.1109881.
18. Davies RH, Heath PJ, Coxon SM, Sayers AR. Evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for Salmonella. *J Appl Microbiol.* 2003;95:1016-1025. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02070.x.
 19. 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. doi: 10.1186/s40813-016-0046-x.
 20. De Lucia A, Edwards SA. Matrici alternative al sangue per la sorveglianza delle malattie trasmissibili del suino [Oral fluids, meat juice, and processing fluids: non-invasive alternative diagnostic medium for disease monitoring in pigs]. *Large Anim Rev.* 2019;25:25-33.
 21. Dee S, Joo HS, Henry S, Tokach L, Park BK, Molitor T, Pijoan C. Detecting subpopulations after PRRS virus infection in large breeding herds using multiple serologic tests. *JSHAP.* 1996;4:181.
 22. Delputte PL, Van Breedam W, Delrue I, Oetke C, Crocker PR, Nauwynck HJ. Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. *J Virol.* 2007;81:9546-9550. doi: 10.1128/JVI.00569-07.
 23. Desrosiers R, Boutin M. An attempt to eradicate porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) after an outbreak in a breeding herd: Eradication strategy and persistence of antibody titers in sows. *JSHAP.* 2002;10:23-25. doi: 10.54846/jshap/319.
 24. 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. doi: 10.3390/ani10071168.
 25. Dieste-Pérez L, van Nes A, van Maanen K, Duinhof T, Tobias T. The prevalence of PCV2 viremia in newborn piglets on four endemically infected Dutch sow farms is very low. *Prev Vet Med* 2018;153:42-46. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.03.001.
 26. Domingo E, Menéndez-Arias L, Quiñones-Mateu ME, Holguín A, Gutiérrez-Rivas M, Martínez MA, Quer J, Novella IS, Holland JJ. Viral quasiespecies and

- the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Prog Drug Res.* 1997;48:99-128. doi: 10.1007/978-3-0348-8861-5_4.
27. Duan X, Nauwynck HJ, Favoreel HW, Pensaert MB. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J Virol.* 1998;72:4520-4523. doi: 10.1128/JVI.72.5.4520-4523.1998.
 28. Dunshea FR, Colantoni C, Howard K, McCauley I, Jackson P, Long KA, Lopaticki S, Nugent EA, Simons JA, Walker J, Hennessy DP. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J Anim Sci.* 2001;79:2524-2535. doi: 10.2527/2001.79102524x.
 29. Dyrektywa Rady 2008/120/WE z dnia 18 grudnia 2008 r. ustanawiająca minimalne normy ochrony świń. Online: <https://sip.lex.pl/akty-prawne/dzienniki-UE/dyrektywa-2008-120-we-ustanawiajaca-minimalne-normy-ochrony-swin-wersja-67853254> (Dostęp: 24.04.2026).
 30. Eddicks M, Koeppen M, Willi S, Fux R, Reese S, Sutter G, Stadler J, Ritzmann M. Low prevalence of porcine circovirus type 2 infections in farrowing sows and corresponding pre-suckling piglets in southern German pig farms. *Vet Microbiol.* 2016;187:70-74. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.03.010.
 31. Eddicks M, Maurer R, Deffner P, Eddicks L, Sipos W, Reese S, Cvjetković V, Krejci R, Opriessnig T, Ritzmann M, Fux R. Cross-Sectional Study on the Prevalence of PCV Types 2 and 3 DNA in Suckling Piglets Compared to Grow-Finish Pigs in Downstream Production. *Pathogens.* 2022;11:671. doi: 10.3390/pathogens11060671.
 32. Europejska Deklaracja na rzecz alternatyw dla kastracji chirurgicznej. Online: https://www.vitalevarkenshouderij.nl/download/386/Downloads/boars-on-the-way/aw_prac_farm_pigs_cast-alt_declaration_en.pdf (Dostęp: 24.04.2026).
 33. Fabisiak M, Podgórska K, Skrzypiec E, Szczotka A, Stadejek T. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in meat juice samples from Polish wild boar (*Sus scrofa* L.). *Acta Vet Hung.* 2013;61:529-536. doi: 10.1556/AVet.2013.027.
 34. 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. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.04.001.
35. 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. *Front Vet Sci.* 2023;10:1187753. doi: 10.3389/fvets.2023.1187753.
 36. Fan M, Hu Z, Bian L, Wang Y, Zhang X, Li X, Wang X. Detection Rate of Porcine Circoviruses in Different Ages and Production Herds of Intensive Pig Farms in China. *Animals (Basel).* 2025;15:1376. doi: 10.3390/ani15101376.
 37. Fehér E, Jakab F, Bányai K. Mechanisms of circovirus immunosuppression and pathogenesis with a focus on porcine circovirus 2: a review. *Vet Q.* 2023;43(1):1-18. doi: 10.1080/01652176.2023.2234430.
 38. Franzo G, Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS One.* 2018;13:e0208585.
 39. Franzo G, Segalés J. Porcine circovirus 2 genotypes, immunity and vaccines: Multiple genotypes but one single serotype. *Pathogens (Basel).* 2020;9:1049.
 40. Franzo G, Tucciarone CM, Dotto G, Gigli A, Ceglie L, Drigo M. International trades, local spread and viral evolution: The case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy. *Infect Genet Evol.* 2015;32:409-415.
 41. Franzo G, Tucciarone CM, Legnardi M, Drigo M, Segalés J. An updated phylogeography and population dynamics of porcine circovirus 2 genotypes: are they reaching an equilibrium? *Front Microbiol.* 2024;15:1500498. doi: 10.3389/fmicb.2024.1500498.
 42. Franzo G, Tucciarone CM, Legnardi M, Melegari I, Berjaoui S, Gatta G, Poletto F, Valente R, Marcone D, Lorusso A, Drigo M, Molini U. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 in Europe: neither wild nor tamed. *Porcine Health Manag.* 2025;11:62. doi: 10.1186/s40813-025-00478-x.
 43. Gong W, Du H, Wang T, Sun H, Peng P, Qin S, Geng H, Zeng Z, Liang W, Ling H, Tu C, Tu Z. Epizootiological surveillance of porcine circoviruses in free-ranging wild boars in China. *Virol Sin.* 2023;38:663-670. doi: 10.1016/j.virs.2023.08.008.
 44. Goyal SM. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 1993;5:656-664. doi: 10.1177/104063879300500435.

45. Grau-Roma L, Hjulsager CK, Sibila M, Kristensen CS, López-Soria S, Enøe C, Casal J, Bøtner A, Nofrarias M, Bille-Hansen V, Fraile L, Baekbo P, Segalés J, Larsen LE. Infection, excretion, seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol.* 2009;135:272-282. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.007.
46. Guo L, Fu Y, Wang Y, Lu Y, Wei Y, Tang Q, Fan P, Liu J, Zhang L, Zhang F, Huang L, Liu D, Li S, Wu H, Liu C. A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/b strain. *PLoS One.* 2012;7:e41463.
47. Harding JC. History of porcine circoviral disease (PCVD) and current western Canadian situation. *Adv Pork Prod.* 2007;18:27-32.
48. Henao-Diaz A, Giménez-Lirola L, Baum DH, Zimmerman J. Guidelines for oral fluid-based surveillance of viral pathogens in swine. *Porcine Health Manag.* 2020;6:28. doi: 10.1186/s40813-020-00168-w.
49. Hjulsager CK, Grau-Roma L, Sibila M, Enøe C, Larsen L, Segalés J. Inter-laboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples. *Vet Microbiol.* 2009;133:172-178. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.06.014.
50. Holtkamp DJ, Polson DD, Torremorell M, Morrison RB, Classen DM, Becton L, Henry SC, Rodibaugh MT, Rowland RRR, Nelson E, Straw BE, Vey P, Yesk P, Zimmerman JJ. Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. *J Swine Health Prod.* 2011;19:44-56.
51. Huang B, Li F, You D, Deng L, Xu T, Lai S, Ai Y, Huang J, Zhou Y, Ge L, Zeng X, Xu Z, Zhu L. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects the reproductive system of male piglets and impairs development of the blood-testis barrier. *Virulence.* 2024;15:2384564. doi: 10.1080/21505594.2024.2384564.
52. Huang Y, Chen X, Long Y, Yang L, Song W, Liu J, Li Q, Liang G, Yu D, Huang C, Tang X. Epidemiological Analysis From 2018 to 2020 in China and Prevention Strategy of Porcine Circovirus Type 2. *Front Vet Sci.* 2021;8:753297. doi: 10.3389/fvets.2021.753297.
53. Igriczi B, Dénes L, Biksi I, Albert E, Révész T, Balka G. High Prevalence of Porcine Circovirus 3 in Hungarian Pig Herds: Results of a Systematic Sampling Protocol. *Viruses.* 2022;14:1219. doi: 10.3390/v14061219.

54. Kappes MA, Faaberg KS. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*. 2015;479-480:475-486. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.012.
55. Karuppannan AK, Opriessnig T. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. *Viruses*. 2017;9:99.
56. Kekarainen T, Segalés J. Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. *Porcine Health Manag*. 2015;19;1:17. doi: 10.1186/s40813-015-0012-z.
57. Kikuti M, Vilalta C, Sanhueza J, Melini CM, Corzo CA. Porcine reproductive and respiratory syndrome prevalence and processing fluids use for diagnosis in United States breeding herds. *Front Vet Sci*. 2022;9:953918. doi: 10.3389/fvets.2022.953918.
58. Labarque GG, Nauwynck HJ, Van Reeth K, Pensaert MB. Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. *J Gen Virol*. 2000;81:1327-1334. doi: 10.1099/0022-1317-81-5-1327.
59. Larochelle R, Bielanski A, Müller P, Magar R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol*. 2000;38:4629-4632. doi: 10.1128/JCM.38.12.4629-4632.2000.
60. Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res*. 2003;67:114-120.
61. Liu X, Wang L, Zhang X, Liu Y, Li Y, Li Z, Geng Z, Zhang L, Liu Y, Liang P, Dong Y, Xu Z, Zhang H, Song C. Identification and biochemical characterization of a novel porcine circovirus associated with porcine respiratory and diarrheal diseases. *Microbiol Spectr*. 2025;13:e0229925. doi: 10.1128/spectrum.02299-25.
62. Loemba HD, Mounir S, Mardassi H, Archambault D, Dea S. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol*. 1996;141:751-761. doi: 10.1007/BF01718333.
63. López OJ, Osorio FA. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;102:155-163. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.09.005.
64. 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;34:859-863. doi: 10.1177/10406387221114855.
65. López WA, Angulo J, Zimmerman JJ, Linhares DCL. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *J Swine Health Prod.* 2018;26:146-150. doi: 10.54846/jshap/1055.
 66. López WA, Gauger PC, Harmon KM, Holtkamp DJ, Cano JP, Macedo N, Zhang M, Silva GS, Angulo J, Zimmerman JJ, Linhares DCL. Probability of PRRS virus detection in pooled processing fluid samples. *Vet Microbiol.* 2021;261:109190. doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109190.
 67. 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. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105021.
 68. Lugo Mesa V., Quinonez Munoz A., Sobhy N.M., Corzo C.A., Goyal S.M.: Survival of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in the Environment. *Vet Sci* 2024;11; 22. doi: 10.3390/vetsci11010022.
 69. Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, Renukaradhya GJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016;4:129-154. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-111025.
 70. Madson DM, Opriessnig T. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Anim Health Res Rev.* 2011;12:47-65. doi: 10.1017/S1466252311000053.
 71. Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol.* 2009;46:707-716. doi: 10.1354/vp.08-VP-0234-O-FL.
 72. Magalhães ES, Zimmerman JJ, Holtkamp DJ, Classen DM, Groth DD, Glowzenski L, Philips R, Silva GS, Linhares DCL. Next Generation of Voluntary PRRS Virus Regional Control Programs. *Front Vet Sci.* 2021;8:769312. doi: 10.3389/fvets.2021.769312.
 73. Martín-Valls GE, Kvisgaard LK, Tello M, Darwich L, Cortey M, Burgara-Estrella AJ, Hernández J, Larsen LE, Mateu E. Analysis of ORF5 and full-length genome sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates of

- genotypes 1 and 2 retrieved worldwide provides evidence that recombination is a common phenomenon and may produce mosaic isolates. *J Virol.* 2014;88:3170-3181. doi: 10.1128/JVI.02858-13.
74. McKeown NE, Opriessnig T, Thomas P, Guenette DK, Elvinger F, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12:1347-1351. doi: 10.1128/CDLI.12.11.1347-1351.2005.
 75. Meerts P, Van Gucht S, Cox E, Vandebosch A, Nauwynck HJ. Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol.* 2005;18:333-341. doi: 10.1089/vim.2005.18.333.
 76. Melegari I, Berjaoui S, Secondini B, Curini V, Di Lollo V, Molini U, Lorusso A, Franzo G. Molecular epidemiology and genetic characterization of PCV2 and PCV3 circulating in domestic pigs and wild boars in central-southern regions of Italy. *BMC Vet Res.* 2025;21:478. doi: 10.1186/s12917-025-04928-0.
 77. 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;10:158-163. doi: 10.1177/104063879801000207.
 78. Nielsen GB, Nielsen JP, Haugegaard J, Leth SC, Larsen LE, Kristensen CS, Pedersen KS, Stege H, Hjulsager CK, Houe H Comparison of serum pools and oral fluid samples for detection of porcine circovirus type 2 by quantitative real-time PCR in finisher pigs. *Porc Health Manag* 2018;4;2. doi: 10.1186/s40813-018-0079-4.
 79. Oh T, Cho H, Suh J, Chae C. Virulence Comparison of Four Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Genotypes (2a, 2b, 2d and 2e) in Pigs Single-Infected with PCV2 and Pigs Dual-Infected with PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Pathol.* 2022;199:88-98. doi: 10.1016/j.jcpa.2022.09.012.
 80. Olsen CW, Karriker LA, Wang C, Binjawadagi B, Renukaradhya GJ, Kittawornrat A, Lizano S, Coetzee J, Main RG, Meiszberg AM, Panyasing Y, Zimmerman JJ. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet J.* 2013;198:158-163. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.06.014.

81. Opriessnig T, Baker RB, Halbur PG. Use of an experimental model to test the efficacy of planned exposure to live porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:1572-1577.
82. Opriessnig T, Kuster C, Halbur PG. Demonstration of porcine circovirus type 2 in the testes and accessory sex glands of a boar. *J Swine Health Prod.* 2006;14:42-45. doi: 10.54846/jshap/465.
83. Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG, Matzinger SR, Meng XJ. Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. *J Gen Virol.* 2014;95:2495.
84. Osemeke OH, de Freitas Costa E, Almeida MN, Trevisan G, Ghosh AP, Silva GS, Linhares DCL. Effect of pooling family oral fluids on the probability of PRRSV RNA detection by RT-rtPCR. *Prev Vet Med.* 2022;206:105701. doi: 10.1016/j.prevetmed.2022.105701.
85. Ostanello F, Caprioli A, Di Francesco A, Battilani M, Sala G, Sarli G, Mandrioli L, McNeilly F, Allan GM, Prosperi S. Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet Microbiol.* 2005;108:179-186. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.04.010.
86. Ouyang T, Zhang X, Liu X, Ren L. Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses. *Viruses.* 2019;11:185. doi: 10.3390/v11020185.
87. Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, Byers E, Hause BM. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *J Virol.* 2017;91:e01879-16.
88. Pejsak Z, Podgórska K. Zespół rozrodczo oddechowy świń. W: Pejsak Z, Pomorska-Mól M, pod red. Zdrowie świń. Prewencja i Terapia. Poznań: Polskie Wydawnictwo Rolnicze; 2021a:290-305.
89. Pejsak Z, Podgórska K. Zespoły chorobowe związane z cirkowirusami świń. W: Pejsak Z, Pomorska-Mól M, pod red. Zdrowie świń. Prewencja i Terapia. Poznań: Polskie Wydawnictwo Rolnicze; 2021b:506-517.
90. Pigiņka-Vjačeslavova I, Birģele E, Šteingolde Ž. Seroprevalence of Porcine Circovirus-2 in Domestic Pigs (*Sus Scrofa Domestica*) in Latvia. *Proc Latv Acad Sci Sect B Nat Exact Appl Sci.* 2018;72:285. doi: 10.2478/prolas-2018-0041.

91. Praharaj I, Jain A, Singh M, Balakrishnan A, Dhodapkar R, Borkakoty B, Ashok M, Das P, Biswas D, Kalawat U, Turuk J, Sugunan AP, Prakash S, Singh AK, Barathidasan R, Subhadra S, Sabat J, Manjunath MJ, Kanta P, Mudhigeti N, Hazarika R, Mishra H, Abhishek K, Santhalembi C, Dikhit MR, Vijay N, Narayan J, Kaur H, Giri S, Gupta N. Pooled testing for COVID-19 diagnosis by real-time RT-PCR: A multi-site comparative evaluation of 5- & 10-sample pooling. *Indian J Med Res.* 2020;152:88-94. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2304_20.
92. Reiner G, Bronnert B, Hohloch C, Fresen C, Haack I, Willems H, Reinacher M. Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol.* 2010;145:1-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.028.
93. Rodríguez-Arrioja GM, Segalés J, Calsamiglia M, Resendes AR, Balasch M, Plana-Duran J, Casal J, Domingo M. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res.* 2002;63:354-357. doi: 10.2460/ajvr.2002.63.354.
94. Romagosa A, Gramer M, Joo HS, Torremorell M. Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza Other Respir Viruses.* 2012;6:110-118. doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00299.x.
95. Rose N, Eveno E, Grasland B, Nignol AC, Oger A, Jestin A, Madec F. Individual risk factors for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs: a hierarchical Bayesian survival analysis. *Prev Vet Med.* 2009;90:168-179. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.04.010.
96. Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 2012;164:78-89. doi: 10.1016/j.virusres.2011.12.002.
97. Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arrioja GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol.* 1999;120:59-78. doi: 10.1053/jcpa.1998.0258.
98. Rudova N, Buttler J, Kovalenko G, Sushko M, Bolotin V, Muzykina L, Zinenko O, Stegnyy B, Dunaiev Y, Sytiuk M, Gerilovych A, Drown DM, Bortz E, Solodiankin O. Genetic Diversity of Porcine Circovirus 2 in Wild Boar and Domestic Pigs in Ukraine. *Viruses.* 2022;14:924. doi: 10.3390/v14050924.

99. Ruedas-Torres I, Rodríguez-Gómez IM, Sánchez-Carvajal JM, Larenas-Muñoz F, Pallarés FJ, Carrasco L, Gómez-Laguna J. The jigsaw of PRRSV virulence. *Vet Microbiol.* 2021;260:109168. doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109168.
100. Saha D, Del Pozo Sacristán R, Van Renne N, Huang L, Decaluwe R, Michiels A, Rodríguez AL, Rodríguez MJ, Durán MG, Declerk I, Maes D, Nauwynck HJ. Anti-porcine circovirus type 2 (PCV2) antibody placental barrier leakage from sow to fetus: Impact on the diagnosis of intra-uterine PCV2 infection. *Virol Sin.* 2014;29:136-138. doi: 10.1007/s12250-014-3432-z.
101. Segalés J, Sibila M. Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. *Vet Sci.* 2022;9:110. doi: 10.3390/vetsci9030110.
102. Segalés J, Sibila M. Speculative Review on the Feasibility of Porcine Circovirus 2 Elimination. *Animals (Basel).* 2025;15(18):2744. doi: 10.3390/ani15182744.
103. Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 2012;164:10-19. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.007.
104. Simer R, Prickett J, Zhou EM, Zimmerman JJ. An improved method for PRRS virus surveillance and monitoring. *Proc International PRRS Symposium.* 2005; St. Louis, MO. Accessed 2020.06.02.
105. Šolaja S, Glišić D, Milićević V. Prevalence of porcine circoviruses 2 and 3 in wild boar in Serbia. *J Vet Diagn Invest.* 2025;37:674-678. doi: 10.1177/10406387251325534.
106. Suh J, Oh T, Park K, Yang S, Cho H, Chae C. A Comparison of Virulence of Three Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Genotypes (a, b, and d) in Pigs Singularly Inoculated with PCV2 and Dually Inoculated with PCV2 and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Pathogens.* 2021;10:891. doi: 10.3390/pathogens10070891.
107. Sur JH, Doster AR, Christian JS, Galeota JA, Wills RW, Zimmerman JJ, Osorio FA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol.* 1997;71:9170-9179. doi: 10.1128/JVI.71.12.9170-9179.1997.
108. Tan CY, Opaskornkul K, Thanawongnuwech R, Arshad SS, Hassan L, Ooi PT. First molecular detection and complete sequence analysis of porcine circovirus

- type 3 (PCV3) in Peninsular Malaysia. *PLoS One*. 2020;15:e0235832. doi: 10.1371/journal.pone.0235832.
109. Timmusk S, Wallgren P, Brunborg IM, Wikström FH, Allan G, Meehan B, McMenamy M, McNeilly F, Fuxler L, Belák K, Pödersoo D, Saar T, Berg M, Fossum C. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Res*. 2008;36:509-520. doi: 10.1007/s11262-008-0217-1.
 110. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*. 1982;295:64-66. doi: 10.1038/295064a0.
 111. 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. In: *Proceedings of the 51st Annual Meeting American Association of Swine Veterinarians*. Atlanta, Georgia, USA; 2020:27-28.
 112. Trevisan G, Jablonski E, Angulo J, López 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. doi: 10.1186/s40813-019-0125-x.
 113. Turlewicz-Podbielska H, Włodarek J, Pomorska-Mól M. Noninvasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review. *J Vet Diagn Invest*. 2020;32:503-512. doi: 10.1177/1040638720936616.
 114. Van Breedam W, Delputte PL, Van Gorp H, Misinzo G, Vanderheijden N, Duan X, Nauwynck HJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol*. 2010;91:1659-1667. doi: 10.1099/vir.0.020503-0.
 115. VanderWaal K, Deen J. Global trends in infectious diseases of swine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115:11495-11500. doi: 10.1073/pnas.1806068115.
 116. Varsani A, Harrach B, Roumagnac P, Benkő M, Breitbart M, Delwart E, Franzo G, Kazlauskas D, Rosario K, Segalés J, Dunay E, Rukundo J, Złotyberg TL, Fehér E, Kaszab E, Bányai K, Krupovic M. 2024 taxonomy update for the family Circoviridae. *Arch Virol*. 2024;169:176. doi: 10.1007/s00705-024-06107-2.
 117. Vicente J, Segalés J, Höfle U, Balasch M, Plana-Durán J, Domingo M, Gortázar C. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the

- European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Res.* 2004;35:243-253. doi: 10.1051/vetres:2004008.
118. Vilalta C, Baker J, Sanhueza J, Murray D, Sponheim A, Alvarez J, Sylvia F, Polson D, Torremorell M, Corzo C, Morrison RB. Effect of litter aggregation and pooling on detection of porcine reproductive and respiratory virus in piglet processing fluids. *J Vet Diagn Invest.* 2019;31:625-628. doi: 10.1177/1040638719852999.
 119. 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;225:149-156. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.09.006.
 120. Vilalta C, Sanhueza JM, Schwartz M, Kikuti M, Torremorell M, Corzo CA. Assessing the litter level agreement of RT-PCR results for porcine reproductive and respiratory syndrome virus in testicles, tails and udder wipes diagnostic samples relative to serum from piglets. *Prev Vet Med.* 2021;186:105211. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105211.
 121. Volpato F, Lima-Morales D, Wink PL, Willig J, de-Paris F, Ashton-Prolla P, Barth AL. Pooling of samples to optimize SARS-CoV-2 diagnosis by RT-qPCR: comparative analysis of two protocols. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40:889-892. doi: 10.1007/s10096-020-04071-8.
 122. Wang Y, Noll L, Lu N, Porter E, Stoy C, Zheng W, Liu X, Peddireddi L, Niederwerder M, Bai J. Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016-2018. *Transbound Emerg Dis.* 2020;67:1284-1294.
 123. Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol.* 2003;41:58-62. doi: 10.1128/JCM.41.1.58-62.2003.
 124. Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB, Christopher-Hennings J, Nelson EA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol.* 1997;55:231-240. doi: 10.1016/S0378-1135(96)01337-5.

125. Woźniak A, Milek D, Matyba P, Stadejek T. Real-Time PCR Detection Patterns of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in Polish Farms with Different Statuses of Vaccination against PCV2. *Viruses*. 2019;11:1135. doi: 10.3390/v11121135.
126. Xiao C, Halbur PG, Opriessnig T. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. *J Virol*. 2012;86:12412-12469.
127. Xiao Q, Qu M, Xie J, Zhu C, Shan Y, Mao A, Qian W, Zhu J, Guo J, Lang D, Niu J, Wen L, He K. Frequency and Genetic Analysis of Porcine Circovirus Type 2, Which Circulated between 2014 and 2021 in Jiangsu, China. *Animals (Basel)*. 2024;14:2882. doi: 10.3390/ani14192882.
128. Yip CCY, Leung KH, Ng ACK, Chan KH, To KKW, Chan JFW, Hung IFN, Cheng VCC, Sridhar S. Comparative evaluation of a dual-target real-time RT-PCR assay for COVID-19 diagnosis and assessment of performance in pooled saliva and nasopharyngeal swab samples. *Expert Rev Mol Diagn*. 2021;21:741-747. doi: 10.1080/14737159.2021.1933445.
129. Yoon IJ, Joo HS, Goyal SM, Molitor TW. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest*. 1994;6:289-292. doi: 10.1177/104063879400600326.
130. Yu S, Opriessnig T, Kitikoon P, Nilubol D, Halbur PG, Thacker E. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;115:261-272. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.11.006.
131. Zhang HH, Hu WQ, Li JY, Liu TN, Zhou JY, Opriessnig T, Xiao CT. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transbound Emerg Dis*. 2019.
132. Zhao D, Yang B, Yuan X, Shen C, Zhang D, Shi X, Zhang T, Cui H, Yang J, Chen X, Hao Y, Zheng H, Zhang K, Liu X. Advanced Research in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Co-infection With Other Pathogens in Swine. *Front Vet Sci*. 2021;8:699561. doi: 10.3389/fvets.2021.699561.
133. Zimmerman JJ, Dee SA, Holtkamp DJ, Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenson GW, Torremorell M, Yang H, Zhang J. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses (Porcine Arteriviruses). In: *Diseases of Swine*. 11th ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons; 2019:685-708

12. Spis rycin i tabel

12.1 Spis rycin

Ryc. 1. Rozmieszczenie geograficzne gospodarstw ujętych w badaniu.

Ryc. 2. Schemat rozcieńczania PRRSV-pozytywnych próbek TOPF do badania metodą ELISA.

Ryc. 3. Schemat rozcieńczania PCV2-pozytywnych próbek TOPF do badania metodą ELISA.

Ryc. 4. Schemat rozcieńczania PRRSV-pozytywnych próbek TOPF do badania metodą RT-qPCR.

Ryc. 5. Schemat rozcieńczania PCV2-pozytywnych próbek TOPF do badania metodą qPCR.

Ryc. 6. Odsetek próbek pozytywnych pod względem przeciwciał przeciwko PRRSV w poszczególnych grupach. Dla TOPF zastosowano różne punkty odcięcia (RP i OT). Wartości oznaczone różnymi literami (^a, ^b) różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$).

Ryc. 7. Odsetek próbek pozytywnych pod względem przeciwciał anty-PCV2 w poszczególnych grupach. Dla TOPF zastosowano różne punkty odcięcia (RP i OT); * wartość statystycznie istotna ($p < 0,05$).

Ryc. 8. Odsetek próbek pozytywnych pod względem RNA PRRSV w poszczególnych grupach przy zastosowaniu dwóch punktów odcięcia dla TOPF.

Ryc. 9. Odsetek próbek pozytywnych pod względem DNA PCV2 w poszczególnych grupach przy zastosowaniu dwóch punktów odcięcia dla TOPF; * wartość statystycznie istotna ($p < 0,05$).

12.2 Spis tabel

Tabela 1. Wartości AUC, ACC oraz OT wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów: sS/Pref – wyniki dla surowicy; TOPFS/P – wyniki dla TOPF.

Tabela 2. Wartości AUC, ACC i OT wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów: sODref – wyniki dla surowicy; TOPFOD – wyniki dla TOPF

Tabela 3. Wartości AUC, ACC oraz OT wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów: sCtref – wyniki dla surowicy; TOPFCt – wyniki RT-qPCR w kierunku RNA PRRSV dla TOPF.

Tabela 4. Wartości AUC, ACC oraz OT wyznaczone przy pomocy analizy krzywych ROC dla różnych klasyfikatorów: sCtref – wyniki dla surowicy; TOPFCt – wyniki qPCR w kierunku DNA PCV2 dla TOPF.

13. Oświadczenia współautorów publikacji

Poznań, 21.04.2026 r.

Prof. dr hab. Małgorzata Pomorska-Mól
Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA PUBLIKACJI

W związku z ubieganiem się lek. wet. Hanny Turlewicz-Podbielskiej o stopień doktora oświadczam, że jestem współautorem następujących publikacji:

1. Turlewicz-Podbielska H., Włodarek J., Pomorska-Mól M. Noninvasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2020, 32(4):503-512.

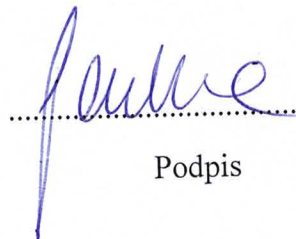
Mój udział w przygotowaniu publikacji wyniósł 20% i polegał na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, analizie piśmiennictwa, recenzji oraz edycji końcowej wersji manuskryptu.

2. Turlewicz-Podbielska H., Dors A., Pomorska-Mól M. Evaluation of the utility of testicular-only processing fluid for PRRSV diagnostics and the effect of sample pooling on the test results. *Journal of Veterinary Research*, 2025, 69(1):7-16.

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. Turlewicz-Podbielska H., Dors A., Pomorska-Mól M. Testicular processing fluid as a useful matrix for the detection of porcine circovirus type 2 DNA and virus-specific antibodies. *Frontiers in Veterinary Science*, 2026, 13:1745725.

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.



.....

Podpis

Poznań, 21.04.2026 r.

dr n. wet. Arkadiusz Dors
Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA PUBLIKACJI

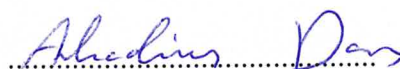
W związku z ubieganiem się lek. wet. Hanny Turlewicz-Podbielskiej o stopień doktora oświadczam, że jestem współautorem następujących publikacji:

1. Turlewicz-Podbielska H., Dors A., Pomorska-Mól M. Evaluation of the utility of testicular-only processing fluid for PRRSV diagnostics and the effect of sample pooling on the test results. Journal of Veterinary Research, 2025, 69(1):7-16.

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.

2. Turlewicz-Podbielska H., Dors A., Pomorska-Mól M. Testicular processing fluid as a useful matrix for the detection of porcine circovirus type 2 DNA and virus-specific antibodies. Frontiers in Veterinary Science, 2026, 13:1745725.

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

Poznań, 21.04.2026 r.

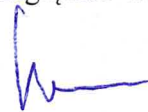
dr n. wet. Jan Włodarek
Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

W związku z ubieganiem się lek. wet. Hanny Turlewicz-Podbielskiej o stopień doktora oświadczam, że jestem współautorem następującej publikacji:

1. Turlewicz-Podbielska H., Włodarek J., Pomorska-Mól M. Noninvasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2020, 32(4):503-512.

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



.....
Podpis

Poznań, 21.04.2026 r.

lek. wet. Hanna Turlewicz-Podbielska
Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA PUBLIKACJI

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

1. Turlewicz-Podbielska H., Włodarek J., Pomorska-Mól M. Noninvasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2020, 32(4):503-512.

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. Turlewicz-Podbielska H., Dors A., Pomorska-Mól M. Evaluation of the utility of testicular-only processing fluid for PRRSV diagnostics and the effect of sample pooling on the test results. Journal of Veterinary Research, 2025, 69(1):7-16.

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. Turlewicz-Podbielska H., Dors A., Pomorska-Mól M. Testicular processing fluid as a useful matrix for the detection of porcine circovirus type 2 DNA and virus-specific antibodies. Frontiers in Veterinary Science, 2026, 13:1745725.

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.

Hanna Turlewicz-Podbielska

Podpis

14. Artykuły wchodzące w skład cyklu

Noninvasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review

Hanna Turlewicz-Podbielska,^{id} Jan Włodarek,
Małgorzata Pomorska-Mól¹^{id}

Abstract. In view of the intensive development of the swine industry, monitoring and surveillance of infectious diseases require low-cost, effective, and representative population sampling methods. We present herein the state of knowledge, to date, in the use of alternative strategies in the monitoring of swine health. Blood sampling, the most commonly used method in veterinary medicine to obtain samples for monitoring swine health, is labor-intensive and expensive, which has resulted in a search for alternative sampling strategies. Oral fluid (OF) is a good alternative to serum for pooled sample analysis, especially for low-prevalence pathogens. Detection of viral nucleic acids or antiviral antibodies in OF is used to detect numerous viruses in the swine population. Meat juice is used as an alternative to serum in serologic testing. Processing fluid obtained during processing of piglets (castration and tail-docking) may also be used to detect viruses. These matrices are simple, safe, cost-effective, and allow testing of many individuals at the same time. The latest methods, such as snout swabs and udder skin wipes, are also promising. These alternative samples are easy to acquire, and do not affect animal welfare negatively.

Key words: meat juice; oral fluid; processing fluid; surveillance; swine viral diseases.

Introduction

Since ~2000, there has been significant intensification of swine husbandry, which has forced changes in the surveillance of infectious pig diseases. The increase in herd size, intensive production, and globalization of the pig industry have led to the emergence of a new class of diseases characterized as comprehensive and multifactorial. Health is a key factor affecting the performance of any breeding system and it has particular importance for the swine industry. Diagnosis and surveillance of such diseases require a combination of comprehensive laboratory testing, implementation of control programs, and monitoring of their effectiveness.

Blood collection from individual animals has been the method used most commonly in veterinary practice to obtain samples for monitoring and surveying the health status of the herd. It is a very labor-intensive method, as well as stressful both for animals and the collecting personnel. Blood collection requires restraining of animals and impairs their welfare, usually requires the involvement of at least 2 people, and could be dangerous for staff taking samples, especially when collecting blood from boars, sows, or animals kept in groups. Routine surveillance based on blood sample testing is also expensive. Alternative matrices, such as oral fluid, processing fluid, meat juice, or even nasal wipes and udder skin wipes, are achieving increasing importance in the management of pig health. Unlike blood samples, such alternatives can be taken in a simple, inexpensive, safe, and noninvasive way.^{12,17}

Oral fluid

Oral fluid (OF) is a mixture of secretions of salivary glands and non-salivary components: gingival secretions, expectorated bronchial and nostril secretions, blood and serum components from wounds in the mouth, bacteria and their products, viruses, fungi, exfoliated epithelial cells and other cellular components, as well as food debris.^{6,63} The first mention of antibodies in OF appeared as early as 1976, when intranasal vaccination of pigs with the Thiverval strain of classical swine fever virus (CSFV) was described. Vaccination resulted in the appearance of antibodies in secretory fluids.⁸ The first diagnostic use of OF was described in 2005; researchers detected the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in 20 of 24 (83%) OF samples and in 17 of 24 (71%) serum samples from finishing pigs, using reverse-transcription PCR (RT-PCR).⁶⁵

OF contains antibodies from 2 sources: salivary glands and serum. The dominant immunoglobulin in saliva is secretory IgA, which is secreted by plasma cells in the salivary

Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Poznań, University of Life Sciences, Poznań, Poland.

¹Corresponding author: Małgorzata Pomorska-Mól, Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Poznań, University of Life Sciences, Poznań, 60-637, Poland. mpomorska@up.poznan.pl

glands. It is the main immunologically active component of saliva. IgM and IgA occur in saliva at lower concentrations.²⁸ Antiviral antibodies as well as elements of viruses can also be detected in saliva and can be used to detect viral infections.³⁹ In the 1970s and 1980s, local antibody production by serum-derived plasma cells in salivary glands and DALT (duct-associated lymphoid tissue) was reported.^{9,43} Evidence for the passage of serum antibodies (IgG, IgM, and IgA) to OF was found in an experiment conducted on rhesus monkeys; isotope-labeled IgG, IgM, and IgA introduced into the circulatory system of monkeys were detected in the OF after 30 min.⁶ In human medicine, saliva is also an alternative to serum, mainly used in the detection of hepatitis A virus and human immunodeficiency virus.²⁷

Collection of OF can be done by a trained breeder or technician, not necessarily by a veterinarian. The fact that pigs are naturally curious animals and show particular interest in easily destructible, chewy, and pliable material, enable this process.^{55,76} OF can be collected from whole pens or from larger groups of pigs with the help of ropes designed for this purpose, or individual samples can be taken with the use of cotton swabs. In 2014, a method called “pathogen sampling wild animals with baits” was used to detect CSFV infection in wild boars.³⁹

OF is taken most often in the form of a pooled sample from a group of animals. However, taking individual OF samples requires the involvement of only one employee, at least one fewer than in the case of blood collection. The volume of OF collected from one animal with a dry cotton swab is sufficient to perform some laboratory tests and even to preserve OF for further analysis.¹⁷ It is also a much less stressful method for animals and is safer for the collector, especially when sampling from sows kept in groups. An important disadvantage of this method is the time required for sampling from one animal, which is twice as long as individual blood collection.¹ Usually 100% cotton, 3-strand, ~12-cm ropes are used for collecting OF from large groups of animals. It is recommended to hang ropes at the pigs’ shoulder level. With animals previously experienced with this type of sampling, it is recommended to give the animals access to the rope for ~20 min, and, if OF is taken for the first time, for ~60 min.⁷⁶ Given difficulties that sometimes occur (e.g., low interest in the rope, small amounts of OF extracted from the rope), the impact has been assessed of using different flavors on the performance of OF collection; acidic or sweet supplements do not affect the efficiency of OF collection from pens.¹¹ Most often, the presence of only a rope is sufficient to attract pigs’ attention and encourage chewing.^{69,70}

The type of material from which the ropes are made has also been assessed. Synthetic ropes can more efficiently accumulate IgA found in OF, and both synthetic and cotton ropes ensure obtaining adequate amounts of IgG, the most important class of antibodies used in tests of OF.¹³ Other studies have proved that raw cotton ropes are best for collecting OF.⁴⁸ The highest amount of PRRSV RT-PCR-positive

samples and the highest correlation between serum and OF results was obtained by using cotton for OF collection.^{30,48} IgM and IgA concentrations differed significantly in one study, depending on the collection material: cotton, hemp, or nylon rope; the lowest IgM and IgA concentrations were found in cotton, but no difference in IgG concentration was observed.⁴⁸

The age of the animals influences the amount of fluid obtained. Sows kept in groups were less interested in ropes than growing-finishing pigs. In one study, it was not possible to collect OF from 40% of pens in which sows were located. Therefore, pen-based sampling seems to be better suited to growing pigs; it was successful in all pens containing 16- and 22-wk-old pigs.¹⁷ It is necessary to conduct further research on the factors influencing the behavior of groups of animals in respect to chewing ropes, which could support the collection of OF and the use of this medium in sows.¹⁷

Although it is possible to test individual OF samples, the main application of this matrix is the analysis of pooled samples representative for many individuals. This is particularly important for monitoring the spread of low-prevalence pathogens. Individual sampling (serum) significantly increases the cost of effective surveillance, given that a relatively large number of these samples must be taken to be representative of the herd. Another important advantage of OF sampling is the minimization of stress associated with taking individual samples. However, there are some restrictions on the implementation of OF sampling. OF may contain particles from the environment (feed, feces, inorganic material) and this contamination can affect test procedures (e.g., reducing the precision of reagent distribution using a pipette).¹⁷ Apathy, a common sign of many diseases, can lead to lack of willingness to interact with the OF collection ropes. Older animals also are less inclined to chew on the ropes. Environmental factors, such as high or low temperature, can also influence the tendency to interact with the rope. Moreover, it is not possible to collect OF with this method from very young piglets.

Oral fluid in the detection of swine viral diseases

Porcine reproductive and respiratory syndrome

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), caused by PRRSV (*Betaarterivirus suid 1 and 2*), is one of the diseases causing the greatest losses in modern pig production.³⁵ Annual PRRS losses in Europe range from an average of €75,724 on slightly affected farms during nursery and fattening periods, to an average of €650,090 if the farm was severely affected at all production stages.^{44,64}

Surveillance of PRRS using OF may be based on the detection of PRRSV nucleic acid or anti-PRRSV antibodies. Most of the serum ELISAs can be modified and used to

detect antibodies in OF. This may require, for example, increasing the sample volume, extending the incubation time, changing the conjugate concentration, or changing the cutoff value.⁵ PRRSV was the first virus detected in OF in pigs.⁵⁶ Since 2008, PCR and ELISAs have been specifically adapted for the detection of many porcine pathogens in OF, and since 2010, routine ELISAs have been offered for detection of anti-PRRSV antibodies in OF.^{4,5}

Many studies indicate that OF is as good a matrix for detecting and monitoring PRRSV infections as is serum. Field studies, conducted in 2008, achieved 77% agreement between RT-PCR and ELISA results obtained from serum and OF.⁵⁶ The same authors also detected PRRSV in serum and OF from pigs experimentally infected with a PRRSV-2 isolate. Both serum and OF were positive in RT real-time PCR (RT-rtPCR) from day 3 after inoculation to 4–5 wk after inoculation.⁵⁶ The kinetics of changes in the amount of virus in serum and OF were similar during the experiment, but with consistently lower virus concentration in OF. Other studies were conducted on production farms in Poland; authors tested the circulation of PRRSV in a pig herd by detecting antibodies and PRRSV nucleic acid in serum and OF using ELISA and RT-PCR. PRRSV antibodies were detected in 58% of pooled serum samples and in 81% of OF samples in farm one, and 75% and 93% on the other farm, respectively.³ Other researchers examined the usefulness of individual and pooled OF samples from growing–finishing pigs and group-housed sows and assessed the performance of commercial ELISAs using OF (OF-ELISA) and serum (SER-ELISA) by conducting tests on individual and pooled samples from 5–10 pigs. The experiment was carried out on a group of 39 growing–finishing pigs and 1,598 sows from 42 herds infected with PRRSV and from 3 herds free from PRRSV. The studies obtained a high level of OF-ELISA sensitivity compared to SER-ELISA, carried out on individual samples, pools of 5, or per pen-based samples. Individual samples, especially for sows, showed low specificity. Pooling 5 samples or using pooled samples from pens increased specificity. The dilution effect caused by false-positive samples may explain the increased specificity.¹⁷

However, using either OF or serum, it is difficult to differentiate maternal antibodies from those produced post-infection or post-vaccination. Given the relatively high concentration of IgG (which may be the result of passive transfer, especially in young animals) compared to other Ig isotypes, commercial ELISAs focus mainly on detecting IgG.⁵⁵ Inoculation with PRRSV-1, -2, or modified-live virus (MLV) leads to the production of IgM and IgA antibodies detectable in serum and OF.²⁹ Therefore later studies focused on detecting both IgA and IgM in OF. According to the authors, the use of ELISAs that simultaneously detect IgA and IgM (PRRSV IgA-IgM ELISA) is a potentially useful tool for monitoring PRRSV, especially in groups of growing piglets from PRRSV-positive or -vaccinated herds in which maternal antibodies may be present for up to 10 wk.⁶⁰

Swine influenza

Swine influenza is caused by influenza A virus (IAV; *Orthomyxoviridae*). Influenza, especially in the endemic form, is associated with significant economic losses. In vivo direct diagnosis of influenza is based on 3 methods: virus isolation (VI), RT-PCR, or rapid point-of-care immunochromatographic tests that capture antigen. Nasal swabs (NSs) are the standard antemortem material used for these tests.²² NS collection is a labor-intensive method; moreover, it requires careful selection of animals and collecting in the first 7 d of infection, when the virus is present in nasal secretions.⁷¹

The feasibility of detecting IAV using the above 3 methods in NS and OF was evaluated, and these 2 types of samples were compared in previous studies.²² The probability of IAV VI from OF and NS was very high at 4 d post-infection (dpi); however, it decreased significantly thereafter. VI was much less successful from OF than from NS, which may be associated with a large amount of anti-IAV (IgA and IgG) antibodies in OF. However, detection of the virus by RT-PCR was possible much longer in OF than in NS; after 6 dpi, the estimated PCR cycle threshold (Ct) decreased, indicating a higher virus concentration. In these studies, Ct values in the OF were usually equal to or even lower than in NS.²² Higher and longer detection of viral RNA in OF is likely a result of IAV replication in bronchial epithelial cells and virus excretion from the lungs by physiologic clearance mechanisms such as coughing.³²

The sensitivity of the PCR reaction used for the detection of IAV in OF and NS has also been evaluated.⁵⁹ The average sensitivity of PCR in this evaluation was > 80% for OF. Less agreement was observed between the results obtained from OF and NS if the prevalence in the pen was < 10%. However, the probability of detecting influenza virus was 99% if the prevalence was > 18% and decreased to 69% if the prevalence was 9%. The kappa value between OF and NS results was 0.82, which indicates that OF is quite a good medium for testing the population.⁵⁹

A commercial ELISA, originally designed to detect anti-nucleoprotein A (NP) antibodies in avian serum, has also been used to detect these antibodies in swine serum. The sensitivity and specificity of this test, carried out on swine serum, was estimated at 96.6% and 99.3%, respectively.⁷ The serum ELISA procedure was modified and adapted to test 182 OF samples taken from pigs infected with the H1N1 and H3N2 subtypes of IAV. NP antibodies were detectable from 7 to 42 dpi (i.e., until the end of the experiment). Sample-to-negative (S/N) ratios for OF and serum in the same pen showed a correlation of 0.796 (Pearson correlation coefficient, $p < 0.0001$).⁵⁰ Detection of IAV NP antibodies in OF was also described in 2016. The authors compared IAV-antibody prevalence in OF pairs and pooled serum samples from pens of 3- to 20-wk-old piglets. The probability of detecting IAV-positive samples in the pen for 3- to 9-wk-old piglets was 40% and 61%, respectively, for OF and serum ($p = 0.04$);

for 10- to 14-wk-old piglets 19% and 93%, respectively, for OF and serum ($p < 0.01$); and for 18- to 20-wk-old piglets 67% and 81%, respectively, for OF and serum ($p = 0.05$).²⁰

Porcine circovirus 2-associated disease

Porcine circovirus 2 (PCV-2; *Circoviridae*) is another pathogen that is responsible for significant economic losses in the global pig industry. Routine detection of PCV-2-associated disease is based on the identification of PCV-2 antigen or DNA in affected tissues in combination with the detection of characteristic histologic lesions (in situ hybridization or immunohistochemistry) in dead or killed diseased pigs. Alternative methods such as serum RT-rtPCR can be used for in vivo testing; the detection of PCV-2 and anti-PCV-2 antibodies in OF has achieved increasing importance.^{46,66}

In a study of 310 pairs of sera and OF, in which the virus content in OF from PCV-2-positive pens was significantly higher than in pooled serum samples, the authors concluded that OF was well suited for detecting PCV-2 in a pen, but was not useful for determining the virus load of individual pigs.⁴⁶ Several studies confirmed the usefulness of OF in the detection of PCV-2 infections and for testing the prevalence of PCV-2 in pens.^{28,56,58} Research has also shown that the amount of PCV-2 in saliva is higher, which means that detection of the virus is possible earlier and longer in OF than in serum.¹⁹ Interpretation of rtPCR reaction results and detected amounts of PCV-2 must be carried out carefully, considering the uncertain number of animals in contact with the OF collection rope and the fact that individual animal shedding levels may vary.²⁴ During another study, anti-PCV-2 antibodies (IgG, IgA, and IgM isotypes) were detectable in OF from experimentally inoculated pigs from 14 dpi, and IgG and IgA isotypes were detectable at 98 dpi.⁵⁷ Although no correlation was observed between the severity of respiratory signs and the detection of PCV-2 in OF, the data indicate the possible use of pooled OF samples for additional diagnosis of porcine circoviral disease at the population level. For effective surveillance, it is recommended that the exposed population be sampled every 2–4 wk.⁵⁶

Classical swine fever

Available data indicate that OF can also be used as a noninvasive medium in the diagnosis of classical swine fever (CSF).⁴⁰ CSFV (*Pestivirus C*) causes one of the most important transboundary swine viral diseases.

CSFV genetic material in OF has been detected in several studies performed on experimentally infected pigs. In one study, authors randomly divided a group of 8 pigs into 2 subgroups of 4 individuals. After inoculation with wild-type Alfort/Tübingen CSFV, oropharyngeal swabs (OS), blood, and OF were collected from each of the 2 groups using sampling baits containing raw cotton embedded in a cereal-based bait matrix. Virus nucleic acid was detected from 7 dpi, which

coincided with the beginning of virus RNA detection in OS. The probability of detecting CSFV RNA in cotton ropes was identical or greater than in individual samples.¹⁴ In another study, CSFV RNA was detected by multiplex RT-rtPCR (mRT-rtPCR) in OF in experimentally infected pigs from 5 dpi.²³

Immune response in serum and OF against 2 CSFV proteins, E2 and Erns, was compared in other studies. Pigs were experimentally infected with moderately pathogenic field strain (ALD, $n = 30$) and MLV virus (LOM strain; $n = 30$). During the experiment, 1,391 OF samples and 591 serum samples, taken 14 d before infection to 28 dpi, were tested. The ELISA revealed the simultaneous appearance of E2- and Erns-specific IgG and IgA in serum and OF; IgG ELISA provided better performance. The authors concluded that the results of OF samples were consistent with those obtained using serum, and that OF can be used on a wide scale for screening a population.⁴⁹ However, cross-reactions of anti-CSFV (E2, Erns) antibodies to other pestiviruses, especially bovine viral diarrhea virus and border disease virus, are known; hence, further research is needed to develop specific antibody testing platforms that would allow proper interpretation of results.³³ The same authors compared the effectiveness of various methods using OF as a medium for testing for CSFV. Virus was detected in serum by RT-rtPCR as early as 2 dpi and as late as 28 dpi. Antigen ELISA-positive results were observed as early as 6 dpi and as late as 17 dpi. According to above-mentioned studies, RT-rtPCR was the most effective ≤ 10 dpi, whereas antibody detection in serum was most effective for identifying infection ≥ 14 dpi.⁵¹ Other researchers inoculated 8 pigs intranasally with the Alfort CSFV strain. No neutralizing antibodies were found in OF during the study. CSFV nucleic acid was detectable by RT-PCR in OF from 8 dpi, which coincided with its initial detection in blood samples. The probability of detecting the virus in OF was equal or even higher compared to the corresponding blood samples.⁵² The method based on OF analysis therefore requires the use of a combination of methods based on the detection of virus and antibodies to obtain the best results in monitoring herd health.

African swine fever

The causative agent of African swine fever (ASF) is the large, double-stranded DNA, enveloped African swine fever virus (ASFV; *Asfivirus*). An indirect, optimized ELISA, capable of detecting antibodies to p30 protein in the serum and OF in experimentally infected pigs was developed. Under experimental conditions, detection of antibodies was possible at 8–12 dpi. Serum ($n = 200$) and OF ($n = 200$) tests showed that OF was as good as serum as a diagnostic medium for ELISA.²¹ Other authors subjected 8 pigs experimentally infected with ASFV to 2 serologic testing techniques: ELISA and immunoperoxidase test. Anti-ASFV antibodies were detectable by both techniques in OF in all animals from the early post-inoculation period to the end of the experiment.⁴² The detection of ASFV genetic material by mRT-rtPCR from OF was described

by other researchers. One of them described early detection of ASFV genetic material, which is crucial to limiting the impact and spread of ASF. Genetic material of ASFV was detected as early as 3 dpi, 2–3 d before the onset of clinical disease.²³ Other studies focused on ASFV DNA survival in excretions, which is an important aspect of shedding of ASFV and infection by indirect contact with contaminated fomites. According to these studies, in OF, ASFV DNA could be detected for 35 d at 4°C, and 14 d at 12°C and 21°C. No ASFV DNA could be detected in OF after storage at 37°C.¹⁰

Swine vesicular disease

Swine vesicular disease virus (SVDV; *Enterovirus B*) causes highly contagious swine vesicular disease, which is clinically indistinguishable from foot-and-mouth disease and can cause huge economic losses in the swine industry.^{62,78} Detection of the SVDV genome in OF using RT-PCR has been described at 1–21 dpi. The authors also isolated the virus from OF, which was possible for 1–5 dpi. Detection of anti-SVDV antibodies using a competitive ELISA based on 5B7 monoclonal antibodies was possible from 5 dpi. Moreover, the studies evaluated the kinetics of IgM and IgA concentrations in OF; IgM were detected from 6 dpi and significantly decreased at 21 dpi, and IgA appeared at 7 dpi and remained at high concentrations in OF until the end of the experiment (28 dpi). The results confirm the potential use of OF as a matrix for the detection of SVDV infection.⁶²

Meat juice

Meat juice (MJ) is a mixture of serum, lymph, and released intracellular fluid. MJ can be obtained easily by thawing a meat sample several times,^{53,54} and can be used as an alternative to serum in serologic testing. Sampling at the abattoir avoids the risk of disease spread associated with farm visits.⁵³ The disadvantage of this method is the possibility of detecting the disease only postmortem.⁵⁴ Numerous factors can affect the amount of antibodies contained in MJ: blood content in muscle tissue, level of pre-slaughter stress related to glycogen content and pH in muscles after slaughter, the level of hydration of the animal, the degree of blood supply to a given muscle, or the amount and presence of fascia in the muscle.^{45,75,77} The choice of muscle for obtaining MJ is significant in terms of detection usefulness: IgG levels were higher in the myocardium and tongue, lower in limb and diaphragm muscles.^{75,77} MJ can be considered as a matrix corresponding to diluted serum; therefore, there may be some discrepancies when comparing the results of the serum and MJ ELISAs. To minimize this discrepancy, a 10-fold lower dilution of MJ than serum should be used for ELISA.⁴⁵

MJ is used as a matrix to detect pathogens in the food chain (*Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii*).⁷⁵ In several European countries, MJ is also widely used for serologic surveillance of *Salmonella* spp. in regulated control programs.^{1,36,41}

MJ can also be used as an appropriate matrix for detecting porcine viral diseases.²⁶ As early as 1998, studies were conducted on the use of MJ in preventive plans for monitoring pseudorabies in swine herds. A commercial ELISA for the detection of pseudorabies glycoprotein E antibodies in MJ samples was adapted for this purpose. The results obtained after analyzing 389 pairs of sera and MJ were compared; considering serum samples as a reference, individual sensitivity was 93.2% and specificity was 98.3%.³¹ Satisfactory results were also obtained using MJ to detect PRRSV infection in pig herds with known PRRSV status. The herds were classified as seropositive or seronegative based on the results of a study of 10 MJ samples collected randomly in an abattoir over a period of 3 mo. The specificity of the indirect ELISA adapted to MJ was 0.98; sensitivity depended on the PRRSV strain. The authors concluded that the use of MJ can give an acceptable level of herd status classification of PRRSV infection; however, veterinarians and farmers should be aware that false-positive results may occur relatively frequently.³⁸

Detection of PRRSV and the first report of the detection of PCV-2 in MJ from the shoulder muscles of wild boars from various regions in Poland was described in 2013.¹⁶ Only one MJ sample was PRRSV positive, whereas anti-PCV-2 antibodies were found in 6 of 142 (4%) samples.¹⁶ The sensitivity and specificity of an ELISA for PRRSV detection in MJ samples collected under experimental conditions were >95% and 100% at each dilution, respectively.³⁷ These studies confirmed the possibility of using MJ in PRRSV surveillance programs based on ELISAs.³⁷

Use of MJ in the diagnosis of CSF in wild boars has been described. A study was carried out on 56 pigs and 21 wild boars infected or vaccinated, and 129 field samples from wild boars. The authors concluded that MJ is a suitable medium for the detection of CSFV, especially in wild boars.⁵⁶ In other studies, MJ was used to detect IgG and IgA antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). Correlations between S/P ratio in serum and MJ results were significant for both IgG and IgA. The experiment proved the excellent performance of the PEDV IgA and PEDV IgG ELISAs in the testing of MJ, and that MJ could be used for routine surveillance of PEDV.⁵⁴ In 2019, researchers used MJ obtained from wild boar muscles to detect antibodies against Japanese encephalitis virus and hepatitis E virus; the authors tested 46 MJ samples from the diaphragm or myocardium, obtaining ELISA specificity and sensitivity of almost 100%.⁷⁷

Processing fluid

Processing fluid (PF) consists of blood and serum obtained during castration and tail-docking (piglet processing), which is usually performed at 3–5 d old. The use of PF for the surveillance of viral diseases in breeding herds and in suckling piglets is not well studied yet, and data regarding this matrix are scarce.

PRRSV replicates in testicular epithelial cells and macrophages, which indicates that fluids obtained during processing might be an appropriate medium for detecting PRRSV.⁶⁵ Higher proportions in the presence of PRRSV-positive males with a greater amount of virus in the samples compared to females were observed. The reason for this may be the properties of this arterivirus, infection of various types of cells in the reproductive tract, and asymptomatic carriage in males. However, further research is needed on the role of sex in persistent PRRSV infections.⁷³ By collecting tails and testicles into separate containers, the visible amount of PF was observed only in containers of tails. Testicular fluid most likely behaves like a support medium and can wash out a small amount of blood from the tails before it clots, so collecting tails and testicles in one container is required. Dilution of the sample by the testicular fluid of PRRSV-negative males could present a risk of obtaining false-negative results when only single PRRSV-positive females are present in a litter. In this situation, there is a risk that the Ct value for RT-PCR may increase and virus load may be below the detection level.⁷³

The results from PF samples were compared with those from serum in several studies. The probability of detecting PRRSV RNA in PF by RT-PCR was greater than the detection of PRRSV RNA in serum samples.³⁴ In other studies, the sensitivity and specificity assessment were carried out on serum and PF of seventy-seven 3-d-old piglets; the kappa value was 0.81 between results obtained from both matrixes. Sensitivity and specificity of PF results compared to serum results were 87% and 94%, respectively.⁷³ PF was also used for longitudinal monitoring of PRRSV status in the herds, which were subject to virus elimination. The experiment was carried out in 29 breeding herds for 65 wk; 93% of farms that had 2 consecutive negative PRRSV results in PFs using RT-rtPCR also had negative PRRSV RT-rtPCR results in the weaned piglets' serum in the same cohort.⁶⁸ The authors of the above experiments claim that PF is a valuable, effective, and economical tool for screening breeding flocks that are attempting PRRSV elimination. In another experiment, scientists compared the use of PF samples with the results obtained using OF and serum. All samples from PRRSV-negative herds were negative on RT-PCR. PRRSV was 100% detected in PRRSV-positive herd samples in all 3 matrices. The kappa value was 1, showing excellent agreement between RT-PCR results with PF, OF, and serum.² The results of other studies reporting the detection of PRRSV RNA in PF indicated that the use of PF in monitoring disease provides reliable results.^{25,61,67}

Not much is known about the impact of pooling PF samples on the ability of PCR to correctly classify a sample as positive. Authors have estimated that aggregation of at least 50 litters was possible when the PCR Ct in the sample was ~22, and up to 40 litters if the Ct value was ~33. Pooling did not affect the results of the PCR reaction if the initial Ct values were ~20 to ~25. For litters with baseline Ct $\geq$ 30, the number of samples in the pool should be limited. The results

of these tests provide a general framework that can help in more detailed analysis and interpretation of the results of monitoring tests carried out using PF—the study was conducted only with 2 strains of PRRSV-2 from 2 farms recently infected with PRRSV.⁷⁴

PF is a promising, practical, and inexpensive matrix, the use of which can improve the monitoring of PRRSV. It allows the testing of more piglets more frequently, which increases the likelihood of detecting the virus with a minimal prevalence. This matrix is particularly easy to obtain in 3- to 5-d-old piglets, when it is not possible to collect OF. Collecting blood samples from such young piglets is also fraught with higher risk than in older animals. Moreover, testing PF allows the rapid classification of piglets as PRRSV-negative or -positive. However, this method does not reveal how many piglets from the pooled sample are positive. There is also the possibility of environmental contamination of samples during processing. The possibility of using PF in the monitoring of other swine viral diseases requires more comprehensive research.

Nasal wipes and udder skin wipes

Implementation of new, cost-effective, and non-disturbing animal welfare methods to collect representative samples of the population is also resulting in the investigation of new matrices: nasal wipes (NWs, also known as snout wipes).

NWs are collected using cotton gauze, which is wiped across the snout, collecting secretions from the snout and nares.⁴⁷ The usefulness of cotton for this purpose is debatable: it is assumed that cotton contains PCR inhibitors,⁷² but cotton ropes are the gold standard for OF collection. There are reports that although fewer viral particles are detected in cotton by RT-rtPCR compared to polyester swabs, cotton gauzes work very well for IAV detection in field studies.²⁰ As mentioned earlier, NSs are the gold standard in IAV detection; however, collection of NSs requires animal restraining, training, and at least 2 employees involved. In contrast, collecting snout wipes requires no special training, is simple, and minimizes the stress on animals, and requires fewer employees involved than NS collection.⁵² It is also highly acceptable in public opinion.^{15,47} NW sampling allows for a quick assessment of the individual pig's health.

The possibility of IAV RNA detection and VI of IAV in material obtained from NWs has been described, which gives this matrix a certain advantage over OF, from which VI is rarely possible. However, there are some restrictions that should be kept in mind when using NWs. Given the contact of the swine snout with the external environment, NS sampling is often associated with the simultaneous collection of many contaminants (litter, food, feces, etc.) that can inhibit the PCR reaction or be toxic to cells when attempting to isolate the virus. Furthermore, the detection of IAV may be the result of environmental pollution and may not always be the result of active shedding by the animal. NW storage in a

freezer or refrigerator for transport also requires 3–4 times more space than NSs. Storing samples for a long time at room temperature, refrigerated, or frozen and thawed, as well as overheating the sample during thawing, results in reduced virus viability.¹⁵

Several studies suggest concordance for IAV detection using RT-rtPCR and VI from NW and NS. The first experiment was conducted on 553 paired NWs and NSs, in which 517 of 553 (93.5%) RT-rtPCR results and 511 of 533 (92.4%) VI results agreed. The estimated sensitivity of RT-rtPCR and VI for NWs compared to NSs was 92.9% and 82.9%, respectively.¹⁵ In the second study, authors also used NWs; 49 of 90 (54%) and 51 of 90 (57%) positive NS and NW samples were detected, respectively.¹⁸ The same authors later compared the usefulness of different matrices, including NWs among others; in fattening farms, the kappa coefficient (0.64) showed significant agreement in the detection of IAV by RT-rtPCR in pooled NS and NW samples.⁷²

Udder skin wipes (USWs) allow assessment of the health status of the litter before weaning. Secretions from the oral and nasal cavities in suckling piglets are deposited on the skin of the sow's udder.⁷² Information about the role of the USW in monitoring viral diseases occurring in litters of suckling piglets is very scarce. Researchers compared 8 different matrices (NSs; NWs, and oropharyngeal swabs; OF; surface wipes, and USWs; airborne particles deposited on surfaces, and air samples) among >1,300 samples from breeding farms and wean-to-finish facilities, and found that USWs together with oropharyngeal swabs were the best matrices for isolation of IAV from suckling piglets. USWs also proved to be suitable for virus detection by RT-rtPCR.¹⁸ Detection and monitoring of PRRSV in the breeding herd using USWs was reported for the first time in 2019. The authors obtained a sensitivity of 43% and a specificity of 98% in their studies on USWs, comparing the results obtained from serum (gold standard). The kappa coefficient during processing time was 0.49. The percentage agreement between the results obtained from USWs and serum was 81.8%. PRRSV was detected at processing in USWs, in environmental wipes and airborne-deposited particle samples up to 14 wk post-outbreak, and at weaning in USWs up to 17 wk post-outbreak.

Ease of collection, minimizing stress, and improved animal welfare support the use of NWs and USWs in commercial herds for surveillance of viral diseases. NWs are a good alternative to NSs. Both the use of NWs to detect other respiratory pathogens in pigs and the use of SWs in the monitoring and detection of infectious diseases require further study.

Conclusion

Serum, as well as NSs, tissue, and organ samples are used most often in the diagnosis of swine viral diseases. However, these methods are costly and labor-intensive. Moreover, they can be hazardous for both animals and the collector and often require

the restraint of animals. Some of these samples can only be obtained postmortem. These problems raise the need for new strategies for sampling and monitoring animal health. Alternative matrices have many advantages over traditional sampling methods. These matrices, in particular OF and PF, offer an opportunity to simplify costly sampling procedures. In the era of ever-increasing requirements for monitoring the health of larger herds, alternative matrices allow for quick assessment of the health status of the herd, and assessment of the effectiveness of implemented eradication methods. Moreover, these methods do not affect animal welfare negatively. The use of alternative matrices requires validation and confirmation of the results obtained in comparison with reference tests.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The scientific activity of M. Pomorska-Mól was supported by statutory funding 506.514.05.00 of the Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań, University of Life Sciences, Poznań, Poland. The scientific activity of H. Turlewicz-Podbielska was supported by grant 506.514.05.00 of the Young Researcher Program of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Poznań, University of Life Sciences, financed by the Polish Ministry of Science and Higher Education.

ORCID iDs

Hanna Turlewicz-Podbielska  <https://orcid.org/0000-0002-4509-8852>

Małgorzata Pomorska-Mól  <https://orcid.org/0000-0003-2220-2730>

References

1. Alban L, et al. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. *Prev Vet Med* 2002;53:133–146.
2. Baliellas J, et al. Active surveillance of PRRSV in breeding, nursery and finishing farms from carcasses. Abstracts of European Symposium on Porcine Health Management; 2019; The Netherlands. [Cited 2020 June 2]. https://eaphm.org/porcine-health-management?%5B0%5D=download_topic_filter%3A192&search_api_fulltext=&page=4
3. Biernacka K, et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and influenza A virus (IAV) in oral fluid of pigs. *Res Vet Sci* 2016;109:74–80.
4. Bjurström-Kraft J, et al. The use of oral fluid diagnostics in swine medicine. *J Swine Health Prod* 2018;26:262–269.
5. Carmeron SO, Carman WF. The use of OraSure® collection device for hepatitis virus testing in health care settings. *J Clin Virol* 2005;34:22–28.
6. Challacombe S, et al. Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys. *Immunology* 1978;35:923–931.

7. Ciacci-Zanella JR, et al. Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. *J Vet Diagn Invest* 2010;22:3–9.
8. Corthier G. Swine fever: influence of passive immunity on pig immune response following vaccination with a live virus vaccine (Thiverval strain). *Ann Vet Res* 1976;7:361–372.
9. Crawford J, et al. Minor salivary glands as a major source of secretory immunoglobulin A in the human oral cavity. *Science* 1975;190:1206–1209.
10. Davies K, et al. Survival of African swine fever virus in excretions from pigs experimentally infected with the Georgia 2007/1 isolate. *Transbound Emerg Dis* 2015;64:425–431.
11. Dawson LL, et al. The effects of flavored rope additives on commercial pen-based oral fluid yield in pigs. *J Vet Behav* 2015;10:267–271.
12. De Lucia A, Edwards SA. Matrici alternative al sangue per la sorveglianza delle malattie trasmissibili del suino [Oral fluids, meat juice, and processing fluids: non-invasive alternative diagnostic medium for disease monitoring in pigs]. *Large Anim Rev* 2019;25:25–33. Italian.
13. Decorte I, et al. Detection of total and PRRSV-specific antibodies in oral fluids collected with different rope types from PRRSV-vaccinated and experimentally infected pigs. *BMC Vet Res* 2014;10:134.
14. Dietze K, et al. Rope-based oral fluid sampling for early detection of classical swine fever in domestic pigs at group level. *BMC Vet Res* 2017;13:5.
15. Edwards JL, et al. Utility of snout wipe samples for influenza A virus surveillance in exhibition swine populations. *Influenza Other Respir Viruses* 2014;8:574–579.
16. Fabisiak M, et al. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in meat juice samples from Polish wild boar (*Sus scrofa* L.). *Acta Vet Hung* 2013;61:529–536.
17. Fablet C, et al. 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.
18. Garrido-Mantilla J, et al. Comparison of individual, group and environmental sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. *BMC Vet Res* 2019;15:61.
19. Gass-Cofré A, et al. Introduction of PCV2-vaccination in a sow farm and effects on virus load in blood and saliva samples. Abstracts of European Symposium on Porcine Health Management; 2019; The Netherlands. [Cited 2020 June 2]. <https://eaphm.org/document/download/85f52314-6e15-42e9-b8e5-97917049c67f/3359>
20. Gerber PF, et al. Using oral fluids samples for indirect influenza A virus surveillance in farmed UK pigs. *Vet Med Sci* 2016;3:3–12.
21. Giménez-Lirola LG, et al. Detection of African swine fever virus antibodies in serum and oral fluid specimens using a recombinant protein 30 (p30) dual matrix indirect ELISA. *PLoS One* 2016;11:e0161230.
22. Goodell CK, et al. Probability of detecting influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2 in individual pig nasal swabs and pen-based oral fluid specimens over time. *Vet Microbiol* 2013;166:450–460.
23. Grau FR, et al. Detection of African swine fever, classical swine fever, and foot-and-mouth disease viruses in swine oral fluids by multiplex reverse transcription real-time polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 2015;27:140–149.
24. Hernandez-Garcia J, et al. The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porcine Health Manag* 2017;3:7.
25. Johnson C, et al. Breed-to-wean farm performance and PRRSV RNA detection in processing fluids over time on a PRRS naive herd vaccinated with MLV vaccine. Abstracts of European Symposium on Porcine Health Management; 2019; The Netherlands. Accessed 2020.06.02: <https://eaphm.org/document/download/26b597d5-2115-460d-a0d2-3fc86806bb84/3168>
26. Kaden V, et al. Meat juice as diagnostic sample for virological and serological diagnosis of classical swine fever. *Dtsch Tierarztl Wschr* 2009;116:173–179.
27. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva—a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:197–212.
28. Kim WI. [Application of oral fluid sample to monitor porcine circovirus-2 infection in pig farms]. *J Vet Clin* 2010;27:704–12. Korean.
29. Kittawornrat A, et al. Kinetics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) humoral immune response in swine serum and oral fluids collected from individual boars. *BMC Vet Res* 2013;9:61.
30. Kittawornrat A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res* 2010;154:170–176.
31. Le Potier MF, et al. Use of muscle exudates for the detection of anti-gE antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet Rec* 1998;143:385–387.
32. Levandowski RA, et al. Modifications of lung clearance mechanisms by acute influenza A infection. *J Lab Clin Med* 1985;106:428–432.
33. Loeffen WL, et al. Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch swine population. *Vet Microbiol* 2009;136:240–245.
34. Lopez W, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *J Swine Health Prod* 2018;26:146–150.
35. Lunney JK, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system. *Ann Rev Anim Biosci* 2016;4:129–154.
36. Merle R, et al. Serological *Salmonella* monitoring in German pig herds: results of the years 2003–2008. *Prev Vet Med* 2011;99:229–233.
37. Molina RM, et al. 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;20:735–743.
38. Mortensen S, et al. Monitoring porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection status in swine herds based on analysis of antibodies in meat juice samples. *Vet Res* 2001;32:441–453.
39. Mortimer PP, Parry JV. The use of saliva for viral diagnosis and screening. *Epidemiol Infect* 1988;101:197–201.

40. Mouchantat S, et al. Novel rope-based sampling of classical swine fever shedding in a group of wild boar showing low contagiousity upon experimental infection with a classical swine fever field strain of genotype 2.3. *Vet Microbiol* 2014;170:425–29.
41. Mousing J, et al. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev Vet Med* 1997;29:247–261.
42. Mur L, et al. Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. *Vet Microbiol* 2013;165:135–139.
43. Nair P, Schroeder H. Duct associated lymphoid tissues (DALT) of minor salivary glands and mucosal immunity. *Immunology* 1986;57:171–180.
44. Nathues H, et al. Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level—an economic disease model. *Prev Vet Med* 2017;142:16–29.
45. Nielsen B, et al. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. *J Vet Diagn Invest* 1998;10:158–163.
46. Nielsen GB, et al. Comparison of serum pools and oral fluid samples for detection of porcine circovirus type 2 by quantitative real-time PCR in finisher pigs. *Porcine Health Manag* 2018;4:2.
47. Nolting JM, et al. Nasal wipes for influenza A virus detection and isolation from swine. *J Vis Exp* 2015;106:53313.
48. Olsen C, et al. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet J* 2013;198:158–163.
49. Panyasing Y, et al. Detection of classical swine fever virus (CSFV) E2 and E^{ms} antibody (IgG, IgA) in oral fluid specimens from inoculated (ALD strain) or vaccinated (LOM strain) pigs. *Vet Microbiol* 2018;224:70–77.
50. Panyasing Y, et al. Detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies in oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions using a blocking ELISA. *Transbound Emerg Dis* 2012;61:177–184.
51. Panyasing Y, et al. Effective surveillance for early classical swine fever virus detection will utilize both virus and antibody detection capabilities. *Vet Microbiol* 2018;216:72–78.
52. Petrini S, et al. Detection of classical swine fever virus infection by individual oral fluid of pigs following experimental inoculation. *J Vet Diagn Invest* 2017;29:254–257.
53. Piñeiro M, et al. 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;87:273–276.
54. Poonsuk K, et al. Detection of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) IgG and IgA in muscle tissue exudate (“meat juice”) specimens. *Porcine Health Manag* 2018;4:31.
55. Prickett J, et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest* 2008;20:156–163.
56. Prickett JR, et al. 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.
57. Prickett JR, et al. Prolonged detection of PCV2 and anti-PCV2 antibody in oral fluids following experimental inoculation. *Transbound Emerg Dis* 2011;58:121–127.
58. Ramirez A, et al. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med* 2012;104:292–300.
59. Romagosa A, et al. Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza Other Resp* 2012;6:110–118.
60. Rotolo ML, et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-specific IgM-IgA in oral fluid samples reveals PRRSV infection in the presence of maternal antibody. *Vet Microbiol* 2017;214:13–20.
61. Sanhueza J, et al. Evaluation of parity as a delaying factor to reach PRRSV stability in sow farms. Abstracts of European Symposium on Porcine Health Management; 2019; The Netherlands. Accessed 2020.06.02: <https://eaphm.org/document/download/c138e780-6bf0-4eee-ab2d-cdc-22ca0ebb7/3108>
62. Senthilkumaran C, et al. Use of oral fluids for detection of virus and antibodies in pigs infected with swine vesicular disease. *Transbound Emerg Dis* 2017;64:1762–1770.
63. Simer R, et al. An improved method for PRRS virus surveillance and monitoring. Proc International PRRS Symposium; 2005; St. Louis, MO. Accessed 2020.06.02: <https://www.pork.org/wp-content/uploads/2008/07/05-146-ZIMMERMAN-ISU.pdf>
64. Stoian A, Rowland R. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine design: reviewing virus glycoprotein interactions with CD163 and targets of virus neutralization. *Vet Sci* 2019;6:9.
65. Sur JH, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* 1997;71:9170–9179.
66. Szczotka-Bochniarz A, Podgórska K. Porcine circovirus type 2 infections in pigs: current terminology, clinical syndromes, and diagnostic criteria. *Med Weter* 2015;71:88–93.
67. Trevisan G, et al. Applications of population-based methods for PRRS monitoring and surveillance in breeding herds undergoing virus elimination. Abstracts of European Symposium on Porcine Health Management; 2019, Netherlands. Accessed 2020.06.02: <https://eaphm.org/document/download/1914cf78-e002-4980-abad-90e5d91232c8/3075>
68. Trevisan G, et al. Use of processing fluid samples for longitudinal monitoring of PRRS virus in herds undergoing virus elimination. *Porcine Health Manag* 2019;5:18.
69. Trickett SL, et al. The role of novelty in environmental enrichment for the weaned pig. *Appl Anim Behav Sci* 2009;116:45–51.
70. Van de Weerd HA, Day JE. A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems. *Appl Anim Behav Sci* 2009;116:1–20.
71. Van Reeth K, et al. Influenza virus. In: Zimmerman JJ, et al., eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Wiley, 2012:557–572.
72. Vilalta C, et al. Indirect assessment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus status in pigs prior to weaning by sampling sows and the environment. *Vet Microbiol* 2019;237:108406.

73. Vilalta C, et al. Use of processing fluids and serum samples to characterize porcine reproductive and respiratory syndrome virus dynamics in 3 day-old pigs. *Vet Microbiol* 2018;225:149–156.
74. Vilalta C, et al. Effect of litter aggregation and pooling on detection of porcine reproductive and respiratory virus in piglet processing fluids. *J Vet Diagn Invest* 2019;31:625–628.
75. Wallander C, et al. “Meat juice” is not a homogeneous serological matrix. *Foodborne Pathog Dis* 2015;12:280–288.
76. White D, et al. Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *J Swine Health Prod* 2014;22:138–141.
77. Yonemitsu K, et al. Detection of anti-viral antibodies from meat juice of wild boars. *J Vet Med Sci* 2019;81:155–159.
78. Zhang G, et al. Molecular evolution of swine vesicular disease virus. *J Gen Virol* 1999;80:639–651.

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

Hanna Turlewicz-Podbielska, Arkadiusz Dors,
 Małgorzata Pomorska-Mól✉

Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases,
 Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences,
 Poznań University of Life Sciences, 60-637 Poznań, Poland
 mpomorska@up.poznan.pl

Received: December 19, 2024

Accepted: February 25, 2025

Abstract

Introduction: The testicular-only processing fluid (TOPF) obtained from piglet testicles after castration could be an alternative sample for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) laboratory diagnosis. If this matrix were proved useful, testing it would spare piglets the stress of blood drawing and eliminate some labour required to take blood samples. The aim of the study was to evaluate the utility of TOPF for this diagnostic purpose. **Material and Methods:** Serum-and-TOPF pairs from male piglets and sera from female piglets were tested using commercial ELISA and real-time RT-PCR kits. For the pooling simulation, 10 µL aliquots of TOPF separated into low-, moderately and highly positive were mixed with appropriate volumes of negative TOPF samples. This simulated pools of 5, 10, 20, 40 and 80 samples containing 1 positive for serological analyses and pools of 10, 20, 40, 80, 160 and 320 samples containing 1 positive in molecular analyses. **Results:** The percentages of anti-porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies were statistically significantly different (P -value < 0.05) between boar sera (69.55%) and TOPF (54.49%), as well as between gilt sera (74.52%) and TOPF. However, after adjusting the cut-off value, no significant differences were noted. The RNA of PRRSV was detected in 21.26% of male sera, 15.23% of TOPFs and 17.00% of female sera. Pooled sample testing revealed discrepancies in positive results associated with the pool size and original sample positivity strength. **Conclusion:** TOPF samples can be a valuable matrix for laboratory PRRS diagnosis in piglets. However, it is important to be aware of the potential for false-negative results.

Keywords: diagnostic matrices, porcine reproductive and respiratory syndrome, processing fluid, testicular-only processing fluid, pigs.

Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a viral infectious disease that has a detrimental impact on the pig farming industry globally, causing significant economic losses (2, 19). The syndrome inflicts severe damage on pigs at various stages of growth (2). In the USA, PRRS outbreaks led to estimated annual financial losses of around \$560 million in 2005. By 2013, productivity losses in the USA due to PRRS were calculated to be as high as \$664 million per year (13, 20). A recent study in Germany focused on the economic impact of PRRS virus (PRRSV) in the country

found that all 21 investigated farms experienced significant losses attributable to the pathogen. The median total loss per farm per year due to PRRS was €74,181, corresponding to a median total loss per sow and year of €255. On average, the impact of PRRS on farm profits was -19.1%, and in the worst case, it was -41% (23). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires sustained and widespread attention as a globally important swine pathogen (7).

The genome of PRRSV has revealed increasing genetic differences over the years, leading to the classification of the virus into two distinct species: *Betaarterivirus suis* 1 (previously known as the European

type or PRRSV-1) and *Betaarterivirus suis* 2 (previously known as the American type or PRRSV-2) (3). The syndrome caused by *Betaarterivirus suis* 1 and *Betaarterivirus suis* 2 is recognised for causing respiratory symptoms, reduced average daily weight gain, mortality in growing/fattening pigs and reproductive problems in sows. The severity of the disease's clinical signs and financial impact varies significantly depending on viral species and strain, host immune status and age, co-infections, and disease stage. The disease can also be subclinical (10, 30).

The use of non-invasive sampling or the use of material that would usually be discarded (e.g., testicles after castration) for diagnostic purposes can help not only reduce the stress of blood collection, which is the regular *ex vivo* diagnostic material from pigs, but also increase the frequency of diagnostic testing in the herd. Early diagnosis is crucial for effective control of infection in swine herds. Using samples obtained during routine procedures implemented on the farm can significantly save time, labour and costs, improving production profitability. Minimising the stress associated with blood collection is also crucial for animal welfare. Therefore, using non-invasive matrices that could replace traditional samples is essential, and should be standard policy for detecting economically important pathogens commonly found on farms (26).

Processing fluid (PF) shows promise for monitoring viral diseases in breeding herds and suckling piglets. A serosanguinous exudate obtained during castration and tail-docking of piglets, PF can be put to good use for detecting PRRSV. Processing fluid has been previously demonstrated to provide a practical and sensitive matrix for PRRSV genetic material detection in viraemic piglets (14–17, 25, 27, 28). In pig farming, there are certain management practices that are carried out during the first week of life, such as piglet processing (including castration and tail docking). Swine castration is performed to control aggressive behaviour and improve pork taste by removing most boar taint. Tail docking is primarily carried out to prevent cannibalism. These practices facilitate the collection of samples which can be used to monitor the epidemiological status of the herd without causing significant inconvenience (27). However, European legislation dictates that tail docking should not be carried out routinely (Council Directive 2008/120/EC of December 18 2008, laying down minimum standards for the protection of pigs); therefore, in our research, we decided to use a model in which the PF consisted only of fluid from testes: testicular-only processing fluid (TOPF).

This study aimed to assess the utility of TOPF collected during piglet castration for PRRSV serological and molecular laboratory diagnosis and the effect of sample pooling on the test results. In addition, whether results obtained from TOPF differed from results obtained from serum collected from male and female piglets was investigated.

Material and Methods

Farms. The study was conducted on 18 Polish commercial pig farms where surgical castration and serological health status monitoring were routinely performed. Two herds had previously been diagnosed as PRRSV-positive, and the status of the remaining farm was unknown.

Sample collection. Samples were collected from 697 3–5-day-old piglets from 62 litters, from 1 to 15 litters per herd. Not all samples were subjected to both molecular and serological analyses because the amount of blood available was limited. Blood samples were collected from the *vena cava cranialis* into clot activator tubes. Testes from individual male piglets were collected into 50 mL Falcon Tubes (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA). Tail docking was not always performed on the farms where the samples were collected. Besides from male piglets, blood samples were also collected from the 263 female piglets which were littermates of the sampled males. All samples were transported to a laboratory in packaging with cooling inserts. Blood was centrifuged at $2,500 \times g$ for 15 min at 4°C to obtain serum. To obtain TOPF, the testes were frozen and thawed twice. Serum and TOPF were kept frozen at –80°C until further analysis.

All samples used in the present study were taken for diagnostic purposes by the veterinarian in charge of the herd and during routine castrations. Therefore, no ethical approval was necessary. Individual oral informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

Detection of antibodies against PRRSV and pooling simulation. A total of 312 serum-and-TOPF pairs from male piglets and sera from 263 female piglets were tested serologically. The presence of PRRSV-specific immunoglobulin G antibodies (Ab) in the serum and TOPF were evaluated using a commercial ELISA kit (PRRS Ab 4.0; Bionote, Hwasung, Republic of Korea) according to the manufacturer's recommendations for serum samples. The ELISA kit was initially validated for detecting anti-RRSV antibodies in serum or plasma from pigs but not for their detection in TOPF. The optical density (OD) was measured at 450 nm with the reference wavelength at 620 nm in an Infinite 200 PRO microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) immediately after the reaction was stopped. Signal-to-positive-control (S/P) ratios were calculated using the following equation: $S/P = (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{negative control mean}}) / (OD_{\text{positive control mean}} - OD_{\text{negative control mean}})$. The sample was considered positive for PRRSV Ab if the S/P ratio was greater than or equal to 0.4 and was regarded as negative if the S/P ratio was less than 0.4.

To evaluate the pooling effect on the test results, samples were classified as low, moderately or highly positive (S/P ranges: 0.40–1.13, 1.14–1.86 and 1.87–2.60, respectively). For each range, four positive samples were randomly selected. Next, for pooling simulation, 10 µL aliquots of TOPF separated into low, moderately and highly positive were mixed with appropriate

volumes of negative TOPF sample to simulate pools of 5, 10, 20, 40 and 80 samples containing 1 positive and 4, 9, 19, 39 and 79 negative samples, respectively. These pooled samples were then tested as described above.

PRRSV genetic material detection and pooling simulation. This part of the study used 348 serum-and-TOPF pairs from male piglets and sera from 341 female piglets. Genetic material was isolated from 100 μ L of each serum or TOPF sample following the manufacturer's instructions using a Viral DNA/RNA kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) and stored at -80°C until further processing. A commercial real-time reverse-transcription (RT)-PCR kit (ViroReal Kit PRRSV Type 1 & 2; Ingenetix, Vienna, Austria) was used for PRRSV RNA detection. The test detects strains of both PRRSV-1 and PRRSV-2. According to the manufacturer's instructions, a sample was considered positive when the threshold cycle (Ct) was <45 . A CFX96 PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was used for the analysis. To evaluate the pooling effect on the test results, samples were first classified as low, moderately or highly positive by Ct, sorting by the ranges ≥ 35 , 25.01–34.99 and ≤ 25 , respectively. Three positive samples were randomly selected from each range. Next, for pooling simulation, 10 μ L aliquots of selected TOPF samples separated by Ct range were mixed with appropriate volumes of PRRSV-negative samples of TOPF to simulate pools of 10, 20, 40, 80, 160 and 320 samples containing 1 positive and 9, 19, 39, 79, 159 and 319 negative samples, respectively. Isolation of RNA and a real-time RT-PCR were then performed on each diluted sample as described above.

Statistical analyses. The Chi-square test of independence was used to determine whether there was a significant difference between the frequency of positive results obtained by the ELISA and the frequency of them as indicated by real-time RT-PCR in the male piglets, female piglets and TOPF with Bonferroni correction for pairwise comparisons. Differences in ELISA S/P values between results obtained from male piglet sera, female piglet sera and TOPF were tested by a nonparametric Kruskal–Wallis test followed by *post hoc* pairwise comparisons using Dunn's test. The results from serum samples were used as a gold standard. Sensitivity (SE), specificity (SP), negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV) and Cohen's kappa coefficient (κ) were calculated for the methods using TOPF instead of serum samples. Receiver operating curve (ROC) analysis was used to determine the optimal cut-off value for TOPF in both commercial tests. The cut-off that provided the best possible SE and SP (closer to the top left corner of the ROC) was selected. The analyses were performed using RStudio (version 4.1.2), except for the ROC, which was created using Statistica 13.3 (Tibco, Palo Alto, CA, USA). The significance level was $\alpha=0.05$, and P-values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Detection of antibodies against PRRSV and pooling simulation. Of the male sera tested, 69.55% (217/312) were anti-PRRSV Ab positive. Among the corresponding TOPFs, 54.49% (170/312) of samples tested positive. Female piglet sera were positive for the antibody 74.52% of the time (196/263). Statistically significant differences were observed in the percentage of positive samples between boar sera and TOPF (P-value < 0.05) and between gilt sera and TOPF (P-value < 0.05) after using the manufacturer's cut-off for both serum and TOPF samples. There were no significant differences in the percentages of positive samples obtained from boar sera and gilt sera (P-value = 0.187). The minimum, maximum and mean values of the samples' S/P ratios are presented in Table 1. Statistically significant differences between the S/P values of boar sera and those of TOPF (P-value < 0.05) and between these values of gilt sera and of TOPF (P-value < 0.05) were found; however, there were no differences between the S/P values obtained from boar sera and those from gilt sera (P-value = 0.235).

Table 1. Minimum, maximum and mean sample-to-positive ratio (S/P) values in the sera of female and male piglets and in testicular-only processing fluid (TOPF)

Parameter	Females	Males	
	Serum S/P	Serum S/P	TOPF S/P
Min.	-0.018	-0.032	-0.030
Mean	1.412	1.279	0.694
Max.	3.500	3.220	2.610

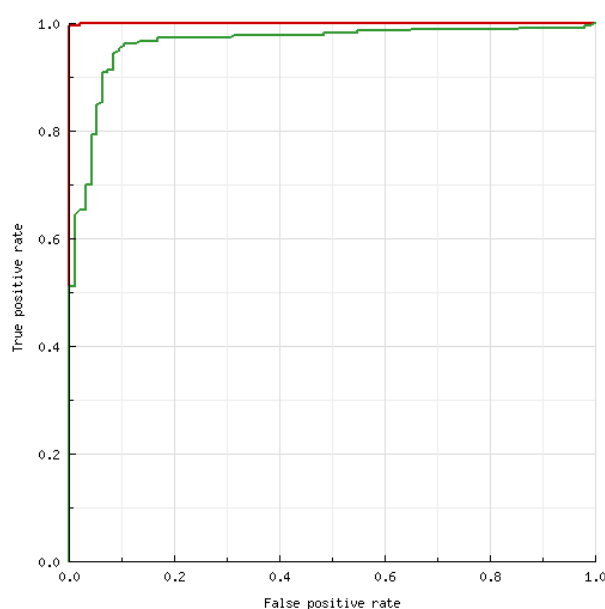


Fig. 1. Receiver operating curve for interpreting the sample-to-positive-control (S/P) ELISA results in testicular-only processing fluid (TOPF). Red line – male serum S/P (reference); green line – TOPF S/P

The ROC analysis (Fig. 1) showed that the best accuracy (area under the curve (AUC): 96.34%) between TOPF and serum ELISA results occurred when the TOPF S/P threshold was ≥ 0.1 . With this cut-off value, 219 (70.19%) TOPF samples were classified as positive

for PRRSV-specific Ab, and no significant differences in the percentage of positive samples between boar sera and TOPF (P-value = 0.861) or between gilt sera and TOPF (P-value = 0.248) were observed. The SE, SP, NPV, PPV and κ calculated for TOPF using the cut-off recommended by the manufacturer of the ELISA assay and the ROC-calculated cut-off are shown in Table 2. The SE, NPV, and K values for TOPF improved significantly after using the new, lower cut-off point.

Pooled TOPF samples were tested based on the ELISA manufacturer's cut-off value to determine the maximum dilution to detect one positive sample in a pool of negatives. Anti-PRRSV antibodies were not detected at dilutions of 1:5 and higher in low-positive samples. Nevertheless, they were found in 20% (4/20) of these samples after applying the ROC-calculated cut-off. In moderately positive samples, 35% (7/20) were correctly classified as positive using the manufacturer's cut-off and 90% were (18/20) using the calculated cut-off. In highly positive samples, 50% (10/20) and

100% (20/20) of samples were correctly classified as positive using the manufacturer's and the ROC-calculated cut-offs, respectively. Detailed information regarding sample classification and S/P values after pooling one TOPF sample with an appropriate number of negative TOPF is presented in Table 3.

Table 2. Sensitivity (SE), specificity (SP), negative and positive predictive values (NPV and PPV), and Cohen's kappa coefficient (κ) obtained for testicular-only processing fluid using the ELISA manufacturer's and receiver operating curve (ROC)-calculated cut-off values

Parameter	ELISA cut-off	
	Manufacturer's (S/P $\geq$ 0.4)	ROC-calculated (S/P $\geq$ 0.1)
SE (%)	76.96	86.47
SP (%)	96.84	96.31
NPV	0.65	0.95
PPV	0.98	0.91
κ	0.65	0.86

S/P – sample-to-positive-control ratio

Table 3. The effect of pooling one low-, one moderately- and one highly-positive testicular-only processing fluid (TOPF) sample (classified by sample-to-positive-control ratio (S/P)) with 4, 9, 19, 39 and 79 negative TOPF samples

Dilution	Low-positive samples				Moderately-positive samples				Highly-positive samples			
	S/P ^a		Cut-off		S/P		Cut-off		S/P		Cut-off	
		Manufacturer's S/P $\geq$ 0.4		Calculated S/P $\geq$ 0.1		Manufacturer's S/P $\geq$ 0.4		Calculated S/P $\geq$ 0.1		Manufacturer's S/P $\geq$ 0.4		Calculated S/P $\geq$ 0.1
Ndil	0.95				1.87				2.18			
1:5	0.35	0		1	0.99	1		1	1.32	1		1
1:10	0.08	0		0	0.51	1		1	0.99	1		1
1:20	0.05	0		0	0.22	0		1	0.54	1		1
1:40	0.04	0		0	0.17	0		1	0.24	0		1
1:80	0.02	0		0	0.12	0		1	0.13	0		1
Ndil	0.71				1.76				2.17			
1:5	0.13	0		1	0.96	1		1	1.16	1		1
1:10	0.08	0		0	0.48	1		1	1.01	1		1
1:20	0.04	0		0	0.26	0		1	0.52	1		1
1:40	0.02	0		0	0.16	0		1	0.31	0		1
1:80	0.01	0		0	0.11	0		1	0.22	0		1
Ndil	0.60				1.69				2.16			
1:5	0.11	0		1	0.81	1		1	1.11	1		1
1:10	0.07	0		0	0.41	1		1	0.62	1		1
1:20	0.03	0		0	0.21	0		1	0.38	0		1
1:40	0.01	0		0	0.1	0		1	0.25	0		1
1:80	0.00	0		0	0.08	0		0	0.16	0		1
Ndil	0.53				1.56				1.95			
1:5	0.14	0		1	0.75	1		1	1.01	1		1
1:10	0.07	0		0	0.24	0		1	0.65	1		1
1:20	0.03	0		0	0.19	0		1	0.15	0		1
1:40	0.00	0		0	0.12	0		1	0.2	0		1
1:80	0.00	0		0	0.09	0		0	0.14	0		1
Correctly classified												
1:5		0/4		4/4		4/4		4/4		4/4		4/4
1:10		0/4		0/4		3/4		4/4		4/4		4/4
1:20		0/4		0/4		0/4		4/4		2/4		4/4
1:40		0/4		0/4		0/4		4/4		0/4		4/4
1:80		0/4		0/4		0/4		2/4		0/4		4/4
Total		0/20		4/20		7/20		18/20		10/20		20/20

Ndil – not diluted

PRRSV genetic material detection and pooling simulation. Of the 348 male sera tested, 74 (21.26%) were PRRSV RNA positive. Among the corresponding TOPFs, 53 (15.23%) samples tested positive. The quota of female serum samples tested was 341, and of them, 58 (17.00%) were positive for PRRSV RNA. No significant differences in the percentages of positive samples between boar sera, TOPF and gilt sera were found when using the manufacturer's cut-off for serum and TOPF samples (P -value = 0.102). The minimum, maximum and mean Ct values are presented in Table 4.

Table 4. Minimum, maximum and mean threshold cycle (Ct) values in the serum of female and male piglets and in testicular-only processing fluid (TOPF)

Parameter	Females	Males	
	Serum Ct	Serum Ct	TOPF Ct
Min.	19.74	19.36	21.27
Mean	34.39	34.16	31.78
Max.	44.52	44.93	44.93

Table 5. Sensitivity (SE), specificity (SP), negative and positive predictive values (NPV and PPV), and Cohen's kappa coefficient (κ) obtained in real-time reverse-transcription (RT)-PCR for testicular-only processing fluid using the manufacturer's and the receiver operating curve (ROC)-calculated cut-off values

Parameter	Real-time RT-PCR cut-off	
	Manufacturer's (Ct < 45)	ROC-calculated (Ct < 43.96)
SE (%)	67.57	67.57
SP (%)	98.91	100.00
NPV	0.94	0.92
PPV	0.92	1.00
κ	0.74	0.77

Ct – cycle threshold

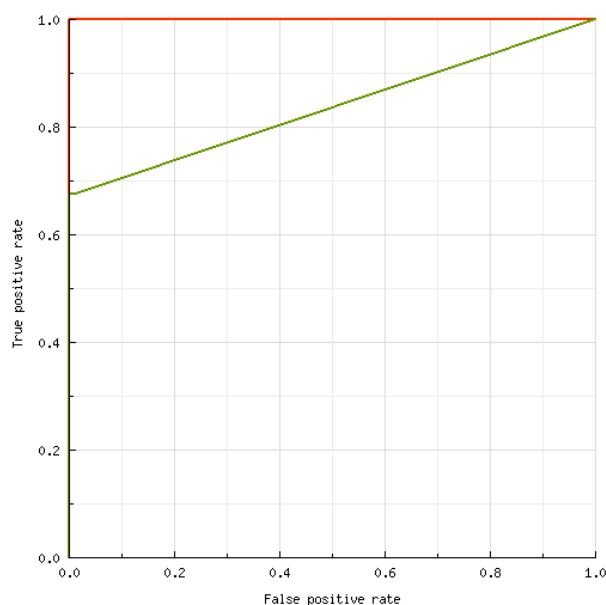


Fig. 2. Receiver operating curve for interpreting threshold cycle (Ct) results in testicular-only processing fluid (TOPF). Red line – male serum Ct (reference); green line – TOPF Ct

The ROC analysis (Fig. 2) showed that the best accuracy (AUC: 83.61%) between TOPF and serum real-time RT-PCR results occurred when the Ct threshold for TOPF was established as <43.96. Using the ROC-calculated cut-off, 14.37% (50/348) of the TOPF samples were classified as positive for PRRSV RNA. After applying the new cut-off for TOPF samples, no significant differences in the percentage of positive samples between boar sera, TOPF and gilt sera were found (P -value = 0.054). The SE, SP, PPV, NPV and κ calculated for TOPF using the cut-off recommended by the manufacturer of the real-time RT-PCR assay and the ROC-calculated cut-off are shown in Table 5. The SP, PPV, and κ values for TOPF improved significantly after using the new, lower cut-off point. However, the SE stayed at the same level.

Based on the cut-off value recommended by the manufacturer of the real-time RT-PCR test, TOPF pools were tested to determine the maximum dilution for detection to still be possible of one positive sample in a pool of negatives. In low-positive samples, viral RNA was detected in only 11.11% (2/18) of samples, regardless of the cut-off. In moderately positive samples, 72.22% (13/18) were classified as positive using the manufacturer's cut-off, and 12/18 (66.66%) were using the ROC-calculated cut-off. All highly positive samples were classified correctly (100%; 18/18) regardless of the applied cut-off. Detailed information regarding sample classification and Ct values after pooling one positive TOPF sample with an appropriate number of negative TOPF samples is presented in Table 6.

Discussion

This study is focused on examining the potential of TOPF obtained only from piglet testicles collected during castration as an alternative matrix for a screening method for identifying the presence of anti-PRRSV Ab and PRRSV RNA in farrow-to-finish or farrow-to-weaning farms. In 2010, a European Declaration on alternatives to surgical castration aimed to end surgical castration by 2018 (4). However, most European countries have not yet met the target set by the declaration. Surgical castration of male piglets is still common on most commercial swine farms (1). There are available several alternatives to surgical castration which serve the same boar-taint-minimising purpose: slaughtering pigs before they reach sexual maturity (8), sperm sexing for the selection of female offspring, genetic selection for pigs with low levels of boar taint and immunocastration (23). Various concerns regarding alternative boar taint mitigation methods are raised because of the additional costs for farmers and uncertainties about consumer attitudes toward meat from pharmacologically castrated pigs. As a result, it is reasonable to assume that a complete ban on surgical castration, whether with or without anaesthesia, may not happen in the short term.

Table 6. The effect of pooling one low-, one moderately- and one highly-positive testicular-only processing fluid (TOPF) sample with 9, 19, 39, 79, 159 and 319 negative TOPF samples

Dilution	Low-positive samples			Moderately-positive samples			Highly-positive samples		
	Ct ^a	Cut-off		Ct	Cut-off		Ct	Cut-off	
		Manufacturer's Ct < 45	Calculated Ct < 43.96		Manufacturer's Ct < 45	Calculated Ct < 43.96		Manufacturer's Ct < 45	Calculated Ct < 43.96
Ndil	38.34	-	-	34.09	-	-	21.9	-	-
1:10	39.16	1	1	35.32	1	1	26.81	1	1
1:20	40.88	1	1	39.05	1	1	27.75	1	1
1:40	0	0	0	39.16	1	1	29.02	1	1
1:80	0	0	0	0	0	0	29.92		1
1:160	0	0	0	0	0	0	30.32	1	1
1:320	0	0	0	0	0	0	32.18	1	1
Ndil	43.7	-	-	34.16	-	-	22.62	-	-
1:10	0	0	0	35.24	1	1	25.08	1	1
1:20	0	0	0	43.00	1	1	25.45	1	1
1:40	0	0	0	43.66	1	1	27.08	1	1
1:80	0	0	0	44.71	1	0	27.85	1	1
1:160	0	0	0	0	0	0	28.04	1	1
1:320	0	0	0	0	0	0	29.43	1	1
Ndil	43.96	-	-	27.7	-	-	25.00	-	-
1:10	0	0	0	29.48	1	1	26.59	1	1
1:20	0	0	0	30.95	1	1	28.38	1	1
1:40	0	0	0	33.36	1	1	29.94	1	1
1:80	0	0	0	33.66	1	1	30.63	1	1
1:160	0	0	0	43.47	1	1	31.28	1	1
1:320	0	0	0	43.78	1	1	33.05	1	1
Correctly classified									
1:10		1/3	1/3		3/3	3/3		3/3	3/3
1:20		1/3	1/3		3/3	3/3		3/3	3/3
1:40		0/3	0/3		3/3	3/3		3/3	3/3
1:80		0/3	0/3		2/3	1/3		3/3	3/3
1:160		0/3	0/3		1/3	1/3		3/3	3/3
1:320		0/3	0/3		1/3	1/3		3/3	3/3
Total		2/18	2/18		13/18	12/18		18/18	18/18

Ct – threshold cycle; Ndil – not diluted

Piglet castration will likely continue to be permissible in Europe for the next few decades. In other major swine-producing countries such as China, the USA and Brazil, the issue of a castration ban has not yet been raised.

The commercial ELISA was initially dedicated to serum samples, and real-time RT-PCR tests dedicated to blood, saliva, semen, faeces, nasal secretions, milk and tissues were used. In order to investigate whether the results from PF obtained solely from boars (TOPF) differed from those obtained from gilt serum, serum taken from female piglets was also included in the analyses. Regarding serological analyses, a significant difference in the percentages of positive samples

between piglet sera (boars and gilts) and TOPF was observed using the cut-off recommended by the manufacturer of the ELISA assay. It indicated that using an unmodified commercial ELISA protocol dedicated to sera to test TOPF led to an incorrect interpretation of the epidemiological situation in the herd. Our findings align with another study on TOPF, which utilised a commercial ELISA to identify antibodies against the hepatitis E virus in piglets. In this study, the agreement between serum and TOPF improved after recalculating the cut-off to a lower value (6).

Our results revealed that the concentration of antibodies specific to PRRSV in TOPF collected from 3–5-day-old boars was significantly lower than the

concentration in their serum. Research on other biological fluids such as oral fluid or meat juice indicated that the antibody concentrations there were significantly lower than in sera (5, 21, 22). This phenomenon can be explained by the inclusion in PF or TOPF of other fluids (lymph and intracellular liquid) and blood which dilute the antibodies in the serum (6, 25, 28). Therefore, evaluating PF or TOPF with tests dedicated to serum without an experimental determination of the correct cut-off point may lead to an increased number of false-negative results. Our results suggested a considerably lower cut-off value is expected for TOPF when using an ELISA initially validated for serum samples.

Our study calculated the new cut-off value for TOPF samples to adapt such an ELISA test to be used with TOPF. After applying the ROC-calculated cut-off value for serological result interpretation, there were no statistically significant differences between the frequency of male piglet serum positive and negative results, the frequencies of female piglet serum results and their equivalents in TOPF results. Using the ROC-calculated cut-off value to interpret the TOPF results significantly improved the validation parameters of the test. The SE value increased from 76.95% to 89.47% and the NPV from 0.65 to 0.91. The two investigated matrices also had a higher agreement ($\kappa = 0.65$ vs 0.86) (Table 2). The validation parameters of the method in which TOPF was tested instead of serum in the ELISA test indicated that after applying a new cut-off value for TOPF, the probability of obtaining false-negative results decreased considerably without any significant increase in the frequency of false-positive results. Determining accurate cut-off values is essential for correctly interpreting the results when working with a new sample type in an ELISA. For instance, Henao-Diaz *et al.* (11) performed a study on oral fluid and discovered that changing the ELISA's cut-off from $S/P \geq 0.4$ to $S/P \geq 1.0$ lowered diagnostic sensitivity slightly from 99.7% to 96.2%, but raised diagnostic specificity from 98.1% to 100% (11, 12).

There were no differences between sexes in the serum ELISA results or between results obtained from TOPF and from male and female serum. These results suggested that testing TOPF may be acceptable for assessing the health status of whole litters when only this material is analysed and no material from female piglets is tested. Validation of this claim requires further research, including on fluid obtained from PRRSV-positive gilts' tails. However, considering the structure of the 3–5-day-old piglet's tail, it is unjustified to expect it to yield a significant volume of fluid for serological testing, even after several defrosting cycles. Moreover, routine tail docking is not recommended, and more and more farms are abandoning this practice (9).

Our pooled-sample findings revealed that the final result depended on the initial concentration of antibodies in the single positive sample which was pooled with an appropriate number of negative samples. When the

ROC-calculated cut-off value was utilised, the number of false-negative pooled samples decreased, and positive samples with higher dilution were still detected. A dilution of 1:5 or higher for low-positive samples resulted in a false-negative outcome when using the manufacturer's cut-off. With the ROC-calculated cut-off, all low-positive samples were correctly classified in a dilution of 1:5. However, the higher dilutions were linked with false-negative results. In the moderately positive samples, antibodies were detected in all of them at the 1:5 dilution and three out of four samples at a 1:10 dilution using the manufacturer's cut-off. After applying the new cut-off, all samples were correctly classified as positive at dilutions of up to 1:40 and two out of four were when at a dilution of 1:80. The overall percentage of correctly classified samples increased from 35% to 90%. Using the ROC-calculated cut-off value for result interpretation in the highly positive samples brought the results into full agreement with the results obtained from non-diluted samples, regardless of dilution (100% correctly classified pooled samples at dilutions up to 1:80). In contrast, when the original cut-off value was applied, 100% correctly classified pooled samples were noted up to 1:10. At 1:20 dilution, only two out of four samples were correctly classified, and higher dilutions gave negative results. It is important to note that the ELISA should be sensitive enough to detect at least one positive animal at a dilution of 1:20 when testing samples from farrowing pens containing as many as 20 piglets. After recalibrating the cut-off value, we successfully detected one positive sample commingled with 19 negative samples in all moderately and highly positive pools. With the new threshold applied, we accurately classified 42 diluted samples out of 60, compared to 17 samples out of the same 60 diluted samples using the manufacturer's threshold. These results align with a similar study by Di Bartolo *et al.* (6) on detecting anti-hepatitis E antibodies in pooled TOPF samples.

Several studies highlighted the reliability of PF as a sample for molecular diagnosis of PRRS (15, 16, 25, 28). In our study, no significant differences in the percentage of positive samples were shown between piglet serum (from boars and gilts) and TOPF or between sexes using the manufacturer's cut-off. The real-time RT-PCR assay performed on TOPF in our study showed very high SP (98.91%), moderate SE (67.57%) and high agreement between TOPF and male sera results ($\kappa = 0.74$). After applying the new cut-off ($Ct < 44.96$), we noted an increase in SP (98.91 vs 100%), and an increase in agreement ($\kappa = 0.77$) between these two matrices. The ROC-calculated cut-off point improved the method's parameters (SP, PPV and κ) and validation when using TOPF as a diagnostic sample. Nevertheless, it is worth noting that the SE of the method was relatively low and did not change regardless of the selected cut-off. After implementing the new cut-off point, noticeable discrepancies in the percentages of positive samples between boar serum samples and TOPF

were observed, indicating suboptimal validation parameters for the method. Conversely, no disparities were noted for gilts and TOPF, mainly because of the lower overall number of positive gilts. Not all true-positive cases may be detected when using TOPF as a diagnostic sample, especially those piglets with low positive Ct values in serum. The results of the real-time RT-PCR using TOPF for PRRSV genetic material detection should be interpreted cautiously. While a positive result is reliable, a negative result from PF carries a high risk of being a false negative. The utility of TOPF in PRRS diagnosis was recently assessed by Vilalta *et al.* (29) in 24 litters of piglets 10 weeks after a PRRSV outbreak. The results from TOPF, PF from tails only and udder wipes were compared with the results from piglet serum as a gold standard. Blood samples, tails and testicles from each piglet in the litter and an udder skin swab from the sow were collected at the time of castration and tail docking (3–5 days after birth). The optimal cut-off points in the real-time RT-PCR assay for classifying a sample as negative were calculated based on statistical analysis, and found to be ≥ 35 Ct for serum and ≥ 36 Ct for pooled samples (testes, tails and udder swabs). Adopting these cut-off points, the use of PF obtained from testes alone gave the best validation parameters and the highest SE (92%; SP = 82%, NPV = 90%, PPV = 85% and overall agreement = 87%). The SE of the assay on PF obtained from tails alone was moderate at 62% and from udder swabs was only 23%, with both matrices giving SP and PPV of 100% (29). Specificity, NPV and PPV were similar in our study. However, we obtained a lower SE. This could be attributed to different real-time RT-PCR assays having been employed in the cited research and in ours, to the aggregation of PF samples from litters as contrasted with the individual piglets tested in our study, or to possible cross-contamination between litters in our research.

In serum analysis conducted by López *et al.* (15), it was found that among 22 litters testing positive for PRRSV, 10 litters contained only a single PRRSV-positive piglet. Consequently, this led to the decision for the present research to take a methodological approach involving diluting one positive sample with multiple negative samples. However, there is a risk of obtaining false-negative results if the number of virus particles in the positive sample is low. López *et al.* (17) stated that including two or more viraemic piglets in a sample increased the likelihood of detecting PRRSV. Combining samples from multiple litters can improve the chances of finding PRRSV-positive piglets. However, we must be cautious when diluting the samples with TOPF from numerous non-viraemic piglets. Our study found that using TOPF as a diagnostic sample in a real-time RT-PCR commercial kit resulted in suboptimal validation parameters. At dilutions up to 1:20, only one out of three low-positive samples was correctly classified as positive, representing 11.11% of all correctly classified samples in this group, regardless of the cut-off point used. Among the moderately positive samples, only one

of the three selected samples with the highest Ct was correctly classified at dilutions up to 1:320, when both cut-off points were used for results interpretation. Overall, even fewer samples were correctly classified as positive after using the new ROC-cut-off in this group (72.22% vs. 66.66%). Interestingly, despite dilution with 319 negative samples, all highly positive samples in our study were still correctly identified with both cut-off points, indicating high accuracy. However, it is important to note that this high accuracy depends on having a high Ct value in the positive TOPF sample. Similar results were observed in a study by López *et al.* (16). They found that the probability of correctly classifying a sample as positive was 95% in a 323-piglet sample containing 28 PRRSV-negative litters and 1 PRRSV-positive litter. According to the regression analysis model proposed by López *et al.* (16) for the serially diluted processing fluid sample, limiting the processing fluid sampling to 30 litters or fewer (around 320 piglets) was expected to provide 95% confidence in detecting PRRSV RNA, even when the prevalence within piglets was close to zero.

We also noted three false-positive results in our study, where a high Ct was obtained in the PF samples but no Ct was measured in the corresponding serum samples. It is important to consider that the virus may be transmitted through contaminated hands or equipment used during castration (18). Collecting blood into a sterile test tube differs from the lengthier and more involved castration procedure for piglets; the longer procedure could cause the contamination of TOPF samples obtained from piglets castrated by veterinarians who had had previous contact with an infected animal. Veterinarians should be mindful of changing gloves and other equipment after each piglet, although this can be challenging in field conditions. Doing so can help prevent false-positive results and cross-contamination, particularly between individual litters or batches.

Our research has shown that TOPF samples can be valuable for diagnosing PRRS and monitoring PRRSV in piglets (boars and gilts). Testing for anti-PRRSV Ab and PRRSV RNA in TOPF samples provides a quick, reliable and economical way to assess the status of PRRSV on pig farms without causing stress or harm to the animals. However, it is important to establish the appropriate cut-off point or dilution for this type of sample and the specific ELISA test to maximise the chances of obtaining the optimal validation parameters. Another limitation is that pooled-sample results from ELISAs and real-time RT-PCRs may not accurately indicate the actual PRRSV status of the herd, especially when they contain TOPF samples with low levels of Ab or viral load. Using an appropriate cut-off point or sample dilution when testing pooled samples in commercial ELISA kits is advisable to reduce the probability of false negatives. The validation parameters of the method using TOPF for molecular testing are not satisfactory because of the low sensitivity, regardless of the cut-off point used. Therefore, the results of TOPF testing for the presence of PRRSV genetic material

should be interpreted with caution, and it is crucial to be aware of the potential for false-negative results, especially from positive individuals with high Ct in serum, as well as to be aware of the possibility of false-positive results from cross-contamination during castration. Nevertheless, the result concordance between TOPF and samples collected from females indicates that TOPF could be used for diagnostic purposes for a whole litter.

Conclusion

Testicular-only processing fluid samples can be a valuable tool for laboratory PRRS diagnosis in piglets. However, it is important to be aware of the potential for false-negative results.

Conflict of Interests Statement: The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Financial Disclosure Statement: The study was financed by the Narodowe Centrum Nauki (National Science Centre), project UMO-2020/37/N/NZ7/00084.

Animal Rights Statement: According to the Act on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes in Poland adopted on 15 January 2015 and according to earlier regulations (Act on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes in Poland adopted on 21 January 2005), the study described in this manuscript did not require the permission of the Local Ethical Commission for Investigations on Animals, as confirmed by the Local Ethical Commission for Investigations on Animals in Poznań at Poznań University of Life Sciences. Informed consent was obtained from the owners of the animals included in the study. The reported study complies with the ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>) for reporting animal experiments. All methods were performed following the relevant guidelines and regulations.

CRedit Authorship Contribution Statement: **Hanna Turlewicz-Podbielska:** research concept and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, writing the article, critical revision of the article, final approval of the article. **Arkadiusz Dors:** collection and assembly of data, data analysis and interpretation, critical revision of the article, final approval of the article. **Malgorzata Pomorska-Mól:** research concept and design, data analysis and interpretation, critical revision of the article, final approval of the article.

References

- Bonneau M., Weiler U.: Pros and Cons of Alternatives to Piglet Castration: Welfare, Boar Taint, and Other Meat Quality Traits. *Animals* 2019, 9, 884, doi: 10.3390/ani9110884.
- Chand R.J., Triple B.R., Rowland R.R.: Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Curr Opin Virol* 2012, 2, 256–263, doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.002.
- Cui X.Y., Xia D.S., Luo L.Z., An T.Q.: Recombination of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Features, Possible Mechanisms, and Future Directions. *Viruses* 2024, 16, 929, doi: 10.3390/v16060929.
- 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, doi: 10.1186/s40813-016-0046-x.
- De Lucia A., Cawthraw S., Davies R., Smith R.P., Bianco C., Ostanello F., Martelli F.: Correlation of Anti-Salmonella Antibodies Between Serum and Saliva Samples Collected From Finisher Pigs. *Front Vet Sci* 2020, 6, 489–496, doi: 10.3389/fvets.2019.00489.
- Di Bartolo I., De Sabato L., Chelli E., Alborali G.L., 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* 2020, 10, 1168, doi: 10.3390/ani10071168.
- Du T., Nan Y., Xiao S., Zhao Q., Zhou M.E.: Antiviral Strategies against PRRSV Infection. *Trends Microbiol* 2017, 25, 968–979, doi: 10.1016/j.tim.2017.06.001.
- Dunshea F.R., Colantoni C., Howard K., McCauley I., Jackson P., Long K.A., Lopaticki S., Nugent E.A., Simons J.A., Walker J., Hennessy D.P.: Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J Anim Sci* 2001, 79, 2524–2535, doi: 10.2527/2001.79102524x.
- Gomes-Neves E., Fontes Teixeira M., Fonseca Cardoso M.: Occurrence of tail docking and tail biting in weaner pigs – A preliminary study in Portuguese abattoirs. *Livest Sci* 2024, 287, 105533, doi: 10.1016/j.livsci.2024.105533.
- Goyal S.M.: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *J Vet Diagn Invest* 1993, 5, 656–664, doi: 10.1177/104063879300500435.
- Henao-Diaz A., Giménez-Lirola L., Baum D.H., Zimmerman J.: Guidelines for oral fluid-based surveillance of viral pathogens in swine. *Porcine Health Manag* 2020, 6, 28, doi: 10.1186/s40813-020-00168-w.
- Henao-Diaz A., Zhang M., Giménez-Lirola L., Gauger P., Baum D., Clavijo M.J., Rotolo M., Ramirez E., Main R., Zimmerman J.: Diagnostic Performance vs Surveillance Performance – The Case of PRRSV Oral Fluid ELISA. In: *Compendium 2020 A collection of NA PRRS Symposium extended abstracts and NC-229 station reports*, University of Illinois Urbana-Champaign College of Veterinary Medicine, Urbana, IL, USA, 2020, pp. 28–32.
- Holtkamp D.J., Kliebenstein J.B., Neumann E.J., Zimmerman J.J., Rotto H., Yoder T.K., Wang C., Yeske P.E., Mowrer C.L., Haley C.A.: Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod* 2013, 21, 72–84.
- Lebre A., Berton P., Normand V., Messenger I., Robert N., Bouchet F., Brissonnier M., Boulbria G.: PRRSV detection by qPCR in processing fluids and serum samples collected in a positive stable breeding herd following mass vaccination of sows with a modified live vaccine. *Porcine Health Manag* 2021, 7, 6, doi: 10.1186/s40813-020-00186-8.
- López W.A., Angulo J., Zimmerman J.J., Linhares D.C.L.: Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *J Swine Health Prod* 2018, 26, 146–150, doi: 10.54846/jshap/1055.
- López W.A., Gauger P.C., Harmon K.M., Holtkamp D.J., Cano J.P., Macedo N., Zhang M., Silva G.S., Angulo J., Zimmerman J.J., Linhares D.C.L.: Probability of PRRS virus detection in pooled processing fluid samples. *Vet Microbiol* 2021, 261, 109190, doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109190.
- López W.A., Zimmerman J.J., Gauger P.C., Harmon K.M., Bradner L., Zhang M., Giménez-Lirola L., Ramirez A., Cano J.P., Linhares D.C.L.: Practical aspects of PRRSV RNA detection in

- processing fluids collected in commercial swine farms. *Prev Vet Med* 2020, 180, 105021, doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105021.
18. Lugo Mesa V., Quinonez Munoz A., Sobhy N.M., Corzo C.A., Goyal S.M.: Survival of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in the Environment. *Vet Sci* 2024, 11, 22, doi: 10.3390/vetsci11010022.
 19. Lunney J.K., Fang Y., Ladinig A., Chen N., Li Y., Rowland B., Renukaradhya G.J.: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci* 2016, 4, 129–154, doi: 10.1146/annurev-animal-022114-111025.
 20. Neumann E.J., Kliebenstein J.B., Johnson C.D., Mabry J.W., Bush E.J., Seitzinger A.H., Green A.L., Zimmerman J.J.: Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 2005, 227, 385–392, doi: 10.2460/javma.2005.227.385.
 21. 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, 158–163, doi: 10.1177/104063879801000207.
 22. Olsen C.W., Karriker L.A., Wang C., Binjawadagi B., Renukaradhya G.J., Kittawornrat A., Lizano S., Coetzee J., Main R.G., Meiszberg A.M., Panyasing Y., Zimmerman J.J.: Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet J* 2013, 198, 158–163, doi: 10.1016/j.tvjl.2013.06.014.
 23. Renken C., Nathues C., Swam H., Fiebig K., Weiss C., Eddicks M., Ritzmann M., Nathues H.: Application of an economic calculator to determine the cost of porcine reproductive and respiratory syndrome at farm-level in 21 pig herds in Germany. *Porcine Health Manag* 2021, 7, 3, doi: 10.1186/s40813-020-00183-x.
 24. Sutherland M.A., Davis B.L., Brooks T.A., McGlone J.J.: Physiology and behavior of pigs before and after castration: effects of two topical anesthetics. *Animal* 2010, 4, 2071–2079, doi: 10.1017/S1751731110001291.
 25. Trevisan G., Jablonski E., Angulo J., Lopez W.A., Linhares D.C.L.: Use of processing fluid samples for longitudinal monitoring of PRRS virus in herds undergoing virus elimination. *Porcine Health Manag* 2019, 5, 18, doi: 10.1186/s40813-019-0125-x.
 26. Turlewicz-Podbielska H., Włodarek J., Pomorska-Mól M.: Non-invasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review. *J Vet Diagn Invest* 2020, 32, 503–512, doi: 10.1177/1040638720936616.
 27. Vilalta C., Baker J., Sanhueza J., Murray D., Sponheim A., Alvarez J., Sylvia F., Polson D., Torremorell M., Corzo C., Morrison R.B.: Effect of litter aggregation and pooling on detection of porcine reproductive and respiratory virus in piglet processing fluids. *J Vet Diagn Invest* 2019, 31, 625–628, doi: 10.1177/1040638719852999.
 28. 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, 149–156, doi: 10.1016/j.vetmic.2018.09.006.
 29. Vilalta C., Sanhueza J.M., Schwartz M., Kikuti M., Torremorell M., Corzo C.A.: Assessing the litter level agreement of RT-PCR results for porcine reproductive and respiratory syndrome virus in testicles, tails and udder wipes diagnostic samples relative to serum from piglets. *Prev Vet Med* 2021, 186, 105211, doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105211.
 30. Zimmerman J.J., Dee S.A., Holtkamp D.J., Murtaugh M.P., Stadejek T., Stevenson G.W., Torremorell M., Yang H., Zhang J.: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses (Porcine Arteriviruses). In: *Diseases of Swine* 11th Edition, edited by J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson, J. Zhang, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2019; pp. 685–708.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Li Chaosi,
Elanco Animal Health, China

REVIEWED BY

Gianmarco Ferrara,
University of Messina, Italy
Carles Vilalta Sans,
Centre de Recerca en Sanitat Animal
(CReSA), Spain

*CORRESPONDENCE

Małgorzata Pomorska-Mól
✉ malgorzata.pomorska@up.poznan.pl

RECEIVED 13 November 2025

REVISED 29 January 2026

ACCEPTED 04 February 2026

PUBLISHED 19 February 2026

CITATION

Turlewicz-Podbielska H, Dors A and
Pomorska-Mól M (2026) Testicular
processing fluid as a useful matrix for
the detection of porcine circovirus type
2 DNA and virus-specific antibodies.
Front. Vet. Sci. 13:1745725.
doi: 10.3389/fvets.2026.1745725

COPYRIGHT

© 2026 Turlewicz-Podbielska, Dors and
Pomorska-Mól. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License](#)
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication
in this journal is cited, in accordance
with accepted academic practice. No
use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

Testicular processing fluid as a useful matrix for the detection of porcine circovirus type 2 DNA and virus-specific antibodies

Hanna Turlewicz-Podbielska, Arkadiusz Dors and
Małgorzata Pomorska-Mól*

Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland

Introduction: Testicular processing fluid (PF) obtained during boar castration may serve as a diagnostic matrix for monitoring porcine circovirus type 2 (PCV2) presence.

Methods: Anti-PCV2 antibodies in PF were detected using an indirect ELISA, and PCV2 DNA was detected by real-time PCR (qPCR), and the effects of sample pooling were evaluated. Paired sera and PF from boars and sera from gilts were tested with commercial ELISA and qPCR kits. PF-specific cut-offs were set by ROC (ELISA OD; qPCR Ct). Pooling was simulated by diluting positive PF samples with negative PF samples at predefined ratios.

Results: With manufacturers' cut-offs, seropositivity was 89.94% (male sera), 87.43% (PF), and 92.81% (gilt sera); differences were observed only between gilt sera and PF. Using the ROC PF cut-off ($OD \geq 0.23$), 88.82% PF were positive, and matrices did not differ; diagnostic agreement metrics for PF improved. In qPCR, positivity was 13.02% (boar sera), 16.90% (PF), and 9.36% (gilt sera). A ROC-specific PCR cut-off ($Ct < 36.50$) improved specificity, predictive values, and agreement without affecting sensitivity; serum and PF Ct values were moderately correlated ($\rho = 0.53$). Pooling reduced detection of weak positives (most notably in qPCR) while high-positive PF remained detectable at higher dilutions.

Discussion and conclusion: These results demonstrate that PF provides a reliable, cost effective alternative to serum for PCV2 surveillance and monitoring when matrix-specific cut-offs are used; however, excessive pooling may lead to false-negative results. This approach may facilitate large-scale herd monitoring while reducing the need for invasive sampling.

KEYWORDS

laboratory diagnostics, non-invasive matrices, PCV2, pig welfare, testicular processing fluid

1 Introduction

Advancements in sampling and diagnostic techniques have simplified the collection of material for farm laboratory diagnostics. Using alternative diagnostic matrices or materials previously discarded, such as testicles after castration, for diagnostic purposes can reduce the need for additional invasive sampling (e.g., venipuncture) and increase the frequency of herd testing for routine pathogen monitoring. Early diagnosis is crucial for effectively controlling infections on farms. Utilizing samples obtained during routine farm procedures can save time, labor, and costs, ultimately improving production profitability. Reducing the need for blood

collection is relevant from both an animal-handling and a logistical perspective, particularly when monitoring economically important pathogens under field conditions (1). Processing fluid (PF) constitutes a serosanguinous exudate obtained during castration and tail-docking of piglets, allowing both antibody detection and molecular detection of viral genetic material, as previously demonstrated for PRRSV (2). It represents a diagnostic sample that can be collected without additional sampling procedures (1, 2). Importantly, the diagnostic application of PF should not be interpreted as an endorsement of surgical castration; rather, its use is confined to production systems where such practices are already routinely implemented. This sample type is promising for monitoring various pathogens circulating in breeding herds and suckling piglets (2–7). Previous studies have reported the detection of the genetic material of porcine circovirus type 2 (PCV2) (7, 8) or other viruses, e.g., porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (6), porcine deltacoronavirus (7), Seneca Valley virus (3) or Atypical Porcine Pestivirus (4) as well as for the detection of antibodies against PRRSV (6) or Hepatitis E virus (5). Piglet processing involves several procedures, including castration and tail docking, which are performed during the first week of life. European Union legislation prohibits routine tail docking (Council of the European Union, 2008, 2016), and measures to minimize the risk of tail biting shall be taken before practicing tail docking, e.g., provision of manipulable material (9). The exact number of pigs that undergo tail docking in Europe is currently unknown. According to Walgreen et al. (9), over 90% of pigs in the EU are tail-docked despite a ban on routine docking. However, it is worth noting that this data originates from several years ago. In the recent study by Gomes-Neves et al. (10) in Portugal, only 22% of 15,683 weaners assessed had docked tails. A decreasing trend in tail-docking is also observed in Poland. Therefore, we use the PF obtained only from boar testes in the present study. The European Declaration on alternatives to surgical castration set a goal to prohibit surgical castration by 2018 (11). However, it seems unlikely that a complete ban on surgical castration, whether with or without anesthesia, will be implemented shortly, as most European countries have not yet achieved the target outlined in the declaration. Surgical castration of male piglets remains prevalent on most commercial swine farms (12). Furthermore, concerns have been raised regarding alternative methods to castration, such as slaughtering pigs before they reach sexual maturity (13), using sperm sexing for the selection of female offspring, genetic selection for pigs with low levels of boar taint, and immunocastration (14). These concerns stem from the additional costs for farmers and uncertainties about consumer attitudes toward meat from pharmacologically castrated pigs. Additionally, the issue of a castration ban has not yet been raised in other major swine-producing countries such as China, the USA, and Brazil.

PCV2 is prevalent in nearly all commercial swine herds globally (15) and is the etiologic agent of porcine circovirus-associated diseases (PCVAD). Current understanding of porcine circovirus diseases (PCVD) caused by PCV-2 encompasses several forms, including sub-clinical infection (PCV-2-SI), systemic disease (PCV-2-SD), reproductive disease (PCV-2-RD), and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) (16). PCV2 infection commonly results in sub-clinical infections, which impact production parameters and cause economic losses for farmers, primarily due to reduced average daily gain (17). Despite the availability of commercial vaccines for many years, mass vaccination has not led to the eradication of the virus (18–20). Understanding the prevalence and dynamics of PCV2 infection is crucial for effectively preventing and controlling its

transmission in pig herds. It is known already that PF offers a practical and cost-effective sample for PCV2 monitoring (7). However, little is known about the impact of sample dilution by PF from PCV2-negative males, which may increase the risk of obtaining false-negative results in litters with only one PCV2 antibody-positive or low viral load in only a few males. This could decrease antibody levels and viral load in pooled samples (21). For PRRSV, the effect of pooling PF samples on molecular detection has been previously evaluated and shown to strongly depend on the initial viral load and dilution level, which may substantially affect diagnostic sensitivity (22). Additionally, no previous studies have evaluated the usefulness of PF obtained only from testicles for PCV2 monitoring. Thus, the present study aimed to assess the usefulness of PF obtained only from testicles collected during male castration for PCV2 serological and molecular diagnostics, as well as the effect of sample pooling on the test results. The study also aimed to investigate the effect of sample pooling on the test results and whether the results obtained from testicular PF differ from those obtained from boar and gilt serum.

2 Materials and methods

2.1 Farms

The samples used in the study originated from 18 Polish commercial pig farms where surgical castration without tail docking was routinely performed (Council Directive 2008/120/EC). Samples from six farms in the Lubelskie Voivodeship, four farms in the Łódzkie Voivodeship, four farms in the West Pomeranian Voivodeship, and one farm each in the Opolskie Voivodeship, Masovian Voivodeship, Pomeranian Voivodeship, and Greater Poland Voivodeship were collected between August 2018 and December 2023. Only one farm in the Lubelskie Voivodeship did not implement vaccination against PCV2, and the active infection in piglets was confirmed on this farm by real-time PCR.

2.2 Sample collection

All samples used in this study were collected by veterinarians caring for a specific herd during routine castrations for veterinary diagnostic purposes. Samples originated from 703 piglets aged 3–5 days from 62 litters. From each litter, 1 to 15 piglets were sampled, depending on availability and herd size. Serum and testis samples were collected from each male piglet on the same day, during routine surgical castration. Blood was drawn before the procedure, and testes were collected immediately afterwards. Blood samples were collected from female piglets belonging to the same litters as the castrated males during the same farm visit. Blood samples were drawn from the vena cava cranialis into clot activator tubes (Medlab-products, Raszyn, Poland). Testes from individual male piglets were collected into 50 mL Falcon Tubes (Fisher Scientific, Hampton, USA). Prior to sample collection, field veterinarians were provided with general instructions to minimize cross- and environmental contamination during routine piglet processing, including the use of separate scalpels and gloves for each piglet. All samples were transported to a laboratory with cooling inserts. The blood was centrifuged at $2500 \times g$ for 15 min at 4 °C to obtain serum. To obtain PF, the testes were defrosted twice at room temperature (20–22 °C) for approximately 30–60 min, depending on sample volume, until complete thawing. The serum and PF were kept

frozen at -80°C until further analysis. Individual oral informed consent was obtained from the owners for their animals' participation in this study. Due to the limited volume of PF obtained from individual piglets, not all samples could be analyzed using both ELISA and real-time PCR. Samples with very low PF volumes were prioritized for ELISA testing, whereas samples with higher volumes were preferentially used for nucleic acid extraction and PCR analysis. Consequently, not all samples were analyzed in paired assays, which resulted in differences in sample numbers between ELISA and PCR analyses.

2.3 Detection of Ab against PCV2 and pooling simulation

Three hundred fifty eight male serum samples and corresponding PF samples, as well as 334 female serum samples, underwent testing using the commercial indirect ELISA kit – Ingezim Circo IgG 11. PCV. K1® (Ingenasa, Madrid, Spain). The kit is based on an indirect ELISA format using a recombinant PCV2 antigen adsorbed to the wells of microtiter plates. Samples (serum or PF) were diluted 1:200 in the dilution buffer provided with the kit (5 μL of serum and 1 mL of diluent). Then, 100 μL of each diluted sample was dispensed into individual wells and incubated at room temperature (RT, approximately $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) for 1 h. After washing three times with the supplied wash buffer, 100 μL of peroxidase-conjugated anti-pig IgG antibody was added to each well and incubated for 30 min at RT. The plates were then washed again, and 100 μL of the TMB substrate solution was added to each well. After a 10-min incubation in the dark at RT, the enzymatic reaction was stopped with 100 μL of the stop solution. The OD was measured at 450 nm with a reference wavelength of 620 nm using the Infinite 200 PRO microplate reader (TECAN, Männedorf, Switzerland) immediately after the reaction was stopped. The manufacturer's cut-off was calculated following the kit's instructions (positive cut-off = OD of negative control + 0.25) for each plate. The term ELISA manufacturer's cut-off used in the text refers to the average from individual plates. The ROC-calculated cut-off determined by ROC curve analysis was set at 0.3. Although the ELISA kit was initially validated for detecting anti-PCV2 antibodies in serum or plasma from pigs, it was not validated for use with PF. To assess the impact of pooling on the test results, the samples were categorized as low, moderate, and high-positives (OD ranges: 0.30–1.00; 1.01–2.00; 2.01–3.76, respectively). Four positive samples were randomly selected for each range. Sample pools were prepared by combining specific volumes of PCV2-positive and PCV2-negative PF to obtain pools with different dilutions (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, and 1:80). For example, to obtain a 1:5 dilution, 50 μL of positive PF was combined with 200 μL of negative PF, resulting in a total of 250 μL of pooled sample. For a 1:10 dilution, 50 μL of positive PF was combined with 450 μL of negative PF. For higher dilutions, at least 10 μL of the positive sample was combined with an appropriate volume of the negative sample. Negative samples were selected based on the results obtained in two different ELISA kits (all samples were tested in triplicate) and subsequently used to dilute PCV2-positive PF samples to create pooled samples of varying dilutions. Pooled samples were then tested as described above.

2.4 PCV2 genetic material detection and pooling simulation

Three hundred sixty one pairs of sera from male piglets and PFs, along with sera from 242 female piglets, were subjected to commercial

real-time PCR kit analyses. The genetic material of PCV2 was extracted from 100 μL of each serum or PF sample using the Viral DNA/RNA kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C until further processing. After initial centrifugation, 100 μL of supernatant was mixed with lysis buffer and isopropanol, then applied to a spin column. The column was washed three times with washing buffer and centrifuged between each step. DNA was eluted in 60 μL of ultrapure water. To detect PCV2 DNA, we employed the ViroReal Kit PCV2 (Ingenetix GmbH, Vienna, Austria), which targets a conserved region within the ORF1 gene of the PCV2 genome. Each PCR reaction was performed in a total volume of 20 μL , consisting of 11 μL of master mix and 9 μL of DNA template. PCR amplification was performed on a Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System. Amplification was performed under the following conditions: initial incubation at 50°C for 2 min (Program 1), denaturation at 95°C for 2 min (Program 2), followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 5 s, annealing and extension at 60°C for 60 s, with fluorescence data collection. A no-template control and a positive control were included in each run, provided with the kit. According to the manufacturer's instructions, a sample was considered positive when the Ct was <45 . To assess the impact of pooling on test results, we categorized samples as low, moderate, and high positives based on Ct ranges (≥ 36 , 30.01–35.99, and ≤ 30 , respectively) and randomly selected two positive samples from each range. Subsequently, pooled samples were prepared by combining appropriate volumes of PCV2-positive PF with PCV2-negative PF to obtain dilutions 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, and 1:320. For instance, to obtain a 1:10 dilution, 50 μL of positive PF was mixed with 450 μL of negative PF, yielding a 500 μL total volume. Similarly, a 1:20 dilution involved 50 μL of positive PF and 950 μL of negative PF. For higher dilutions, at least 10 μL of the positive sample was combined with an appropriate volume of the negative sample. This approach ensured accurate dilution while providing enough volume for nucleic acid extraction. DNA was extracted using the Viral DNA/RNA kit (A&A Biotechnology, Poland), which yields 60 μL of eluate per sample. PCV2-negative samples were selected based on the results obtained from real-time PCR testing of individual samples (in triplicate) and subsequently used to dilute PCV2-positive PF samples to create pooled samples of varying sizes. DNA isolation and real-time PCR were performed on each diluted sample as previously described.

2.5 Statistical analyses

Statistical analyses were performed between individual PF samples obtained from male piglets and paired serum samples collected from the same animals, and not at the litter or batch level. Although samples originated from 62 litters, each was treated as independent, reflecting the study's aim to assess diagnostic performance on a population scale rather than model within-litter variation. For evaluating diagnostic agreement, serum samples were treated as the reference standard. The Chi-square test of independence was utilized to determine if there is a significant difference in the frequency of positive results in the ELISA and real-time PCR between male piglets, female piglets, and PF, with Bonferroni correction for pairwise comparisons. Due to the non-normal distribution of ELISA OD values in all tested sample types (as determined by the Shapiro–Wilk test), pairwise differences between serum from male piglets, serum from female piglets, and PF were evaluated using the Mann–Whitney *U* test (Wilcoxon rank-sum test). Sensitivity (SE), specificity (SP), negative predictive

value (NPV), negative predictive value (PPV), and Cohen's kappa coefficient (K) were computed for the method using PF instead of serum samples in commercial ELISA and real-time PCR tests. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was used to determine the optimal cut-off value for PF in both tests. The cut-off that yielded the best possible SE and SP (closer to the top left corner of the ROC curve) was chosen. Due to the non-normal distribution of Ct values observed in both serum and processing fluid (Shapiro–Wilk test, $p < 0.001$), the relationship between paired values was assessed using Spearman's rank correlation coefficient. The analysis included samples in which PCV2 DNA was detectable in serum, PF, or both ($n = 67$). For statistical consistency and appropriate ranking, samples with undetectable PCV2 DNA were assigned a Ct value of 45.1 (following the PCR kit manufacturer's instruction, indicating that Ct values above 45 should be considered negative). The analyses were conducted using RStudio (version 4.5.1.) with the following packages: stats for Shapiro–Wilk normality tests, Wilcoxon rank sum tests, Spearman's rank correlation coefficient, and Chi-squared tests; caret and epiR for generating confusion matrices and estimating diagnostic accuracy measures (SE, SP, NPV, PPV, K, and confidence intervals); ggplot2 for data visualization. The ROC curve was generated using Statistica 13.3 (Tibco, USA). The significance level was set at $\alpha = 0.05$, and a p -value < 0.05 was considered statistically significant.

3 Results

3.1 Detection of Ab against PCV2 and pooling simulation

Out of the male sera tested, 89.94% (322/358) showed positive results for anti-PCV2 antibodies. Among the corresponding PFs, 87.43% (313/358) of samples tested positive. 92.81% (310/334) of the sera tested from gilts were positive. After applying the manufacturer's cut-off for both serum and PF samples, significant differences were observed in the percentage of positive samples between gilt sera and PF ($p < 0.05$). However, there were no significant differences in the percentage of positive samples obtained from boar sera and PF ($p = 0.288$) and between boar and gilt sera ($p = 0.180$). Table 1 presents the minimum, maximum, and average optical density values (OD). Significant differences between mean OD values of boar sera and PF ($p < 0.05$) and between gilt sera and PF ($p < 0.05$) were observed; however, no differences in OD values obtained from boar and gilt sera were found ($p = 0.101$) (Figure 1). The analysis of the ROC curve (Figure 2) indicated that the highest accuracy [area under the curve (AUC): 98.87%] in comparing PF and serum ELISA results was achieved when the cut-off for PF OD was ≥ 0.23 . Using this

threshold, 88.82% (318/358) of PF samples were identified as positive for PCV2-specific antibodies, and there were no significant differences in the percentage of positive samples between boar sera and PF ($p = 0.63$) and between gilt sera and PF ($p = 0.07$). Table 2 shows SE, SP, NPV, PPV, and K calculated for PF using both the manufacturer-recommended ELISA assay cut-off and the ROC-calculated cut-off values. SE, NPV, and K values for PF notably improved after the implementation of the ROC-calculated cut-off value. The contingency table presents the true positive, true negative, false positive, and false negative results of ELISA after applying the manufacturer's cut-off and the ROC-calculated cut-off (Table 3).

In the next step, PF pools were tested to determine the maximum dilution and detect a single positive sample among a pool of negatives. Using the cut-off value recommended by the manufacturer, anti-PCV2 antibodies were detected in 2 out of four low-positive samples at dilutions of 1:10. Nevertheless, using the calculated cut-off, three out of four samples at dilution 1:10 and in two out of four samples at dilution 1:20 were classified as positive. In general, 25% (5/20) and 40% (8/20) 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, three out of four samples at dilution 1:20, two out of four samples at dilution 1:40 and one out of four samples at dilution 1:80. Using ROC-calculated cut-off, all moderate-positive samples were correctly classified at dilution 1:20, three out of them at dilution 1:40 and one of the at dilution 1:80. In total, 70% (14/20) and 80% (16/20) of moderate-positive samples were correctly classified as positive after applying manufacturer's and ROC-calculated cut-off, respectively. All high-positive samples were classified correctly regardless of the cut-off used. The detailed information regarding sample classification and OD values after pooling one PF sample with an appropriate number of negative PF is presented in Table 4.

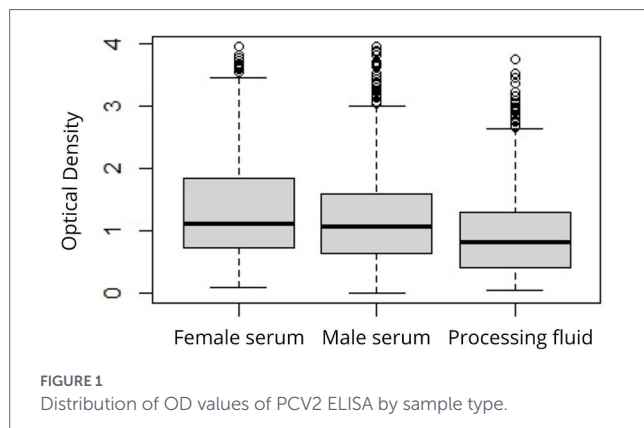
3.2 Detection of PCV2 genetic material and pooling simulation

Of the 361 male sera tested, 13.02% (47/361) were PCV2-positive. Among the corresponding PFs, 16.90% (61/361) of the samples tested positive. 9.36% (32/342) of the sera tested from gilts were positive. No significant differences in the percentage of positive samples between boar sera and PF ($p = 0.144$) and boar sera and gilt sera ($p = 0.124$) were found when using the manufacturer's cut-off. However, a significant difference was found between gilt sera and PF ($p < 0.05$). The minimum, maximum, and average values of Ct are presented in Table 5. The ROC curve analysis (Figure 3) revealed that the best accuracy (AUC: 98.31%) between PF and serum real-time PCR results was achieved when the Ct threshold for PF was set at < 36.50 . Using the ROC-calculated cut-off, 12.47% (45/361) of the PF samples were classified as positive for PCV2 DNA, and no significant differences in the percentage of positive samples between boar sera, PF, and gilt sera were found ($p = 0.267$). The SE, SP, PPV, NPV, and K values calculated for PF using the cut-off recommended by the assay manufacturer and the ROC-calculated cut-off are shown in Table 6. The SP, PPV, NPV and K values for PF improved after using the new, lower cut-off point. However, the SE stayed at the same level. The contingency table presents true positive and true negative, as well as false positive and false negative results of real-time PCR after applying the manufacturer's cut-off and the ROC-calculated cut-off (Table 7). Among 67 samples

TABLE 1 Minimum (min.), maximum (max.), and average OD (optical density) in the serum of females, males, and PF.

Parameter	Female sera OD	Male sera OD	PF OD
Min.	0.087	0.011	0.057
Mean	1.405 ^a	1.280 ^a	0.987 ^b
Max	3.951	3.946	3.761

Different letters indicate statistical differences.



with detectable Ct values in at least one matrix (serum or PF; [Supplementary material](#)), we found a moderate and statistically significant positive correlation between serum and PF Ct values ($\rho = 0.53$, $p < 0.05$). The correlation between Ct values and serum and PF is presented in [Figure 4](#). Samples in which PCV2 DNA was undetectable in one of the matrices were included by assigning a Ct value of 45.1, as described in the Methods.

Then, PF pools were tested to determine the maximum dilution that allows for the detection of one positive sample in a pool of negatives. Viral DNA was not detected in any low-positive samples, regardless of the applied cut-off after dilution. In moderate-positive samples, viral DNA was detected in one sample at a dilution of 1:80. Overall, 33.33% (4/12) and 0% (0/12) of diluted moderate-positive samples were correctly classified as positive using the manufacturer's and ROC-calculated cut-off, respectively. PCV2 DNA was detected in all dilutions (100%; 12/12) when the manufacturer's cut-off was used in high-positive samples. After applying the ROC-calculated cut-off, the virus's genetic material was detectable in two samples at a dilution of 1:80 and one at a dilution of 1:320. 83.33% (10/12) of the dilutions in high-positive samples were classified correctly after using the ROC-calculated threshold. Detailed information regarding sample classification and Ct values after pooling one PF sample with an appropriate number of negative PF samples is presented in [Table 8](#).

4 Discussion

This study assessed the suitability of testicular PF as a valuable sample for detecting anti-PCV2 antibodies and PCV2 genetic material. The study utilized a commercially available ELISA, initially designed for serum samples, and a commercial real-time PCR assay, originally developed for serum, urine, feces, and tracheobronchial swabs, to identify anti-PCV2 antibodies and PCV2 DNA, respectively, in PF samples. Serum samples from female piglets were included in the analyses to determine whether there were differences between boar and gilt serum results, as well as PF and serum female results. Most previously published studies on PF have analyzed samples collected during piglet processing that included both castration and tail docking. Consequently, such PF represents a composite sample derived from testes and tails. In contrast, the present study focused exclusively on processing fluid obtained from testes during male castration. This distinction may influence sample composition and representativeness and should be considered when comparing results

across studies and extrapolating findings from testicular processing fluid to conventional processing fluid collected at the litter or batch level.

In the case of PCV2, most commercial swine herds are seropositive, resulting in efficient transfer of PCV2-specific antibodies from vaccinated or naturally exposed sows to their offspring via colostrum (23). Moreover, once the fetus becomes immunocompetent, from approximately day 70 of gestation, in utero exposure to PCV2 may result in the birth of healthy seropositive piglets (24, 25). Most samples, both from porcine serum and PF, originated from herds that had undergone vaccinations. Hence, these samples tested positive for anti-PCV2 antibodies, likely due to the passive transfer of maternal antibodies via colostrum. The serological analyses revealed a significant difference in the OD values between PF and the serum. We found a notable contrast in the percentage of positive samples between gilt sera and PF when using the manufacturer's cut-off. It is important to consider that applying the results obtained from the testicular PF to the entire group of tested animals, including gilts, could lead to an inaccurate epidemiological assessment of the herd regarding PCV2. Upon reducing the cut-off from 0.30 to 0.23, no statistically significant difference in the percentage of positive samples was found between gilts and PF. It implies the potential acceptability testing of PF derived only from boar testicles to evaluate the health status of the entire sampled animal cohort, including gilts. This adjustment improved the method's validation parameters, such as SP, NPV, and K value, but slightly decreased SE. This means that while applying an ROC-optimized lower cut-off may improve sensitivity and reduce the number of false negatives, it may also slightly increase the risk of false positives, depending on the characteristics of the ELISA. Our findings align with another study on PF, which utilized a commercial ELISA to detect antibodies against the Hepatitis E virus in piglets. This study also found that recalculating the cut-off to a lower value improved the agreement between serum and PF (5).

Pooling experiments were performed as a proof-of-concept to illustrate the effect of dilution on PF-based ELISA and real-time PCR detection and were not intended as a quantitative population-level assessment. Upon examination of pooled samples, it was found that the final result was influenced by the initial concentration of antibodies in a single positive sample. The utilization of the ROC-calculated cut-off value reduced the number of false-negative pooled samples within low- and moderate-positive samples. In the low-positive category, 25 and 40% of samples were classified as positive using the manufacturer's and ROC-calculated cut-off, respectively. In the moderate-positive category, 60 and 80% of samples were accurately classified using the manufacturer's and ROC-calculated cut-off, respectively. Altering the cut-off did not influence the outcomes within the high-positive group. The ELISA must exhibit sufficient sensitivity to identify at least one positive animal in a dilution of around 1:20 when testing samples from farrowing pens, usually containing up to 20 piglets. Following the recalibration of the cut-off value, one positive sample was successfully detected amidst 19 negative samples within all moderate and high-positive pools in our study. Overall, 44 diluted samples were accurately classified using the new threshold, compared to 37 samples classified using the manufacturer's threshold, out of the 60 diluted samples. These outcomes are consistent with a similar study by Di Bartolo et al. (5) about detecting anti-Hepatitis E antibodies in PF pooled samples. Based on the results of the present study, it is worth noting that pooling PF

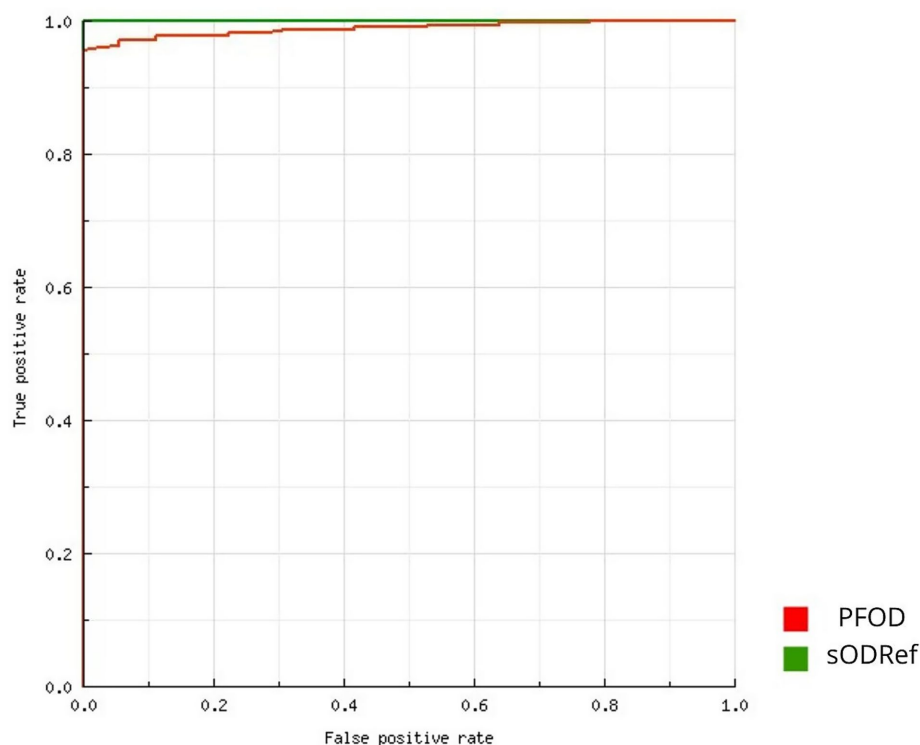


FIGURE 2

ROC curve for interpreting OD ELISA results in PF. PFOD: processing fluid OD. sODRef: male serum OD (reference).

TABLE 2 Sensitivity (SE), specificity (SP), negative and positive predictive values (NPV, PPV), and Cohen's Kappa coefficient (K) obtained for PF using ELISA manufacturer's and ROC-calculated cut-off values.

Parameter	Manufacturer's cut-off (OD ^a ≥ 0.30)	95% CI ^b	ROC-calculated cut-off (OD ≥ 0.23)	95% CI
SE (%)	97.20 (313/322)	94.76–98.71	98.45 (317/322)	96.41–99.93
SP (%)	100.00 (36/36)	90.26–100.00	97.22 (35/36)	85.47–99.93
PPV (%)	100.00 (313/313)	98.83–100.00	99.69 (317/318)	97.87–99.95
NPV (%)	80.00 (36/45)	67.75–88.40	87.50 (35/40)	74.54–94.36
K	0.87	0.79–0.96	0.91	0.84–0.98

Crude numbers are shown as numerator/denominator. SE was calculated as true positives/(true positives + false negatives), SP as true negatives/(true negatives + false positives), PPV as true positives/(true positives + false positives), and NPV as true negatives/(true negatives + false negatives). All metrics were calculated for individual male PF samples using male serum as the reference method. ^aOptical Density; ^bConfidence interval.

TABLE 3 2 × 2 contingency table comparing ELISA results (positive/negative) from PF and male piglet serum samples using two different cut-off values: the manufacturer-recommended cut-off and the ROC-calculated cut-off.

PF ELISA result	Manufacturer's cut-off		ROC-based cut-off	
	Male serum positive	Male serum negative	Male serum positive	Male serum negative
PF positive	313	0	317	1
PF negative	9	36	5	35

Serum was used as the reference method.

samples may lead to an underestimation of herd-level seroprevalence of PCV2, particularly in cases with low or moderate antibody levels, due to dilution effects.

Several studies have highlighted the reliability of PFs for molecular detection of PCV2 or other porcine viruses (3, 4, 6, 8). The present study noted a significant disparity in the percentage of PCR-positive samples between female serum and PF when employing the manufacturer's cut-off. However, as these samples originate from different animal populations, this comparison should be interpreted with caution. Importantly, no significant differences were observed between PCR results obtained from male serum and corresponding PF samples. In addition, the proportion of PCR-positive animals did not differ significantly between male and female piglets across the PCV2-positive farms included in this study. The application of the ROC-optimized threshold reduced the discrepancy observed between female serum samples and PF results, indicating that this difference was primarily related to matrix-specific diagnostic performance rather than true population-level variation. The analysis also revealed that the real-time PCR test conducted on PF exhibited a high sensitivity (SE) of 87.23% and specificity (SP) of 93.63%, with a substantial

TABLE 4 Impact of pooling and dilution (1:5, 1:10, 1:20, 1:40 and 1:80) on ELISA detection of processing fluid (PF) samples with low, moderate and high optical density (OD) values.

Dilution	Low-positive samples			Moderate-positive samples			High-positive samples		
	OD ^a	Cut-off		OD	Cut-off		OD	Cut-off	
		Manufacturer's OD ≥ 0.30	Calculated OD ≥ 0.23		Manufacturer's OD ≥ 0.30	Calculated OD ≥ 0.23		Manufacturer's OD ≥ 0.30	Calculated OD ≥ 0.23
Ndil ^b	0.88			1.88			2.24		
1:5	0.65	+	+	0.99	+	+	1.85	+	+
1:10	0.54	+	+	0.86	+	+	0.86	+	+
1:20	0.29	–	+	0.70	+	+	0.74	+	+
1:40	0.22	–	–	0.62	+	+	0.61	+	+
1:80	0.17	–	–	0.46	+	+	0.45	+	+
Ndil	0.80			1.74			2.21		
1:5	0.61	+	+	0.96	+	+	1.68	+	+
1:10	0.39	+	+	0.78	+	+	1.18	+	+
1:20	0.30	+	+	0.44	+	+	0.93	+	+
1:40	0.14	–	–	0.30	+	+	0.81	+	+
1:80	0.12	–	–	0.20	–	–	0.61	+	+
Ndil	0.48			1.16			2.02		
1:5	0.26	–	+	0.74	+	+	1.48	+	+
1:10	0.23	–	+	0.67	+	+	1.16	+	+
1:20	0.22	–	–	0.48	+	+	0.85	+	+
1:40	0.17	–	–	0.28	–	+	0.77	+	+
1:80	0.11	–	–	0.21	–	–	0.39	+	+
Ndil	0.39			1.13			2.01		
1:5	0.14	–	–	0.68	+	+	1.43	+	+
1:10	0.14	–	–	0.42	+	+	1.06	+	+
1:20	0.10	–	–	0.29	–	+	0.74	+	+
1:40	0.11	–	–	0.18	–	–	0.66	+	+
1:80	0.00	–	–	0.12	–	–	0.41	+	+
Correctly classified		5/20	8/20		14/20	16/20		20/20	20/20

Cut-off classification is shown as “+” (positive) and “–” (negative) according to the manufacturer’s and ROC-calculated cut-off values. ^aOptical density; ^bNot diluted; Low-, moderate- and high-positive samples were defined based on initial ELISA OD values as follows: low-positive, OD 0.30–1.00; moderate-positive, OD 1.01–2.00; high-positive, OD 2.01–3.76.

TABLE 5 Minimum (min.), maximum (max.), and average Ct (Cycle threshold) values in the positive samples of female sera, male sera, and PF.

Parameter	Females	Males	
	Serum Ct	Serum Ct	PF Ct
Min.	26.02	26.38	24.38
Mean	31.53	31.84	32.96
Max	38.56	42.07	42.98

agreement between PF and male sera ($K = 0.72$). Upon implementing the new threshold ($Ct < 36.50$), we observed an enhancement in SE (93.63 to 98.04%) and an improvement in K value (0.72 to 0.90) between these two sample types. The threshold point determined by the ROC curve bolstered the validation parameters of the method utilizing PF as a diagnostic sample (SE, PPV, NPV, and K). Notably, the SE of the method remained unchanged, irrespective of the chosen threshold. It is worth mentioning that using PF as a diagnostic sample may not identify all true positive samples, particularly from piglets with high Ct values in serum. Therefore, the outcomes of real-time PCR utilizing PF for PCV2 genetic material identification should be carefully interpreted. Using the manufacturer's cut-off, we observed 20 positive PF from pigs with negative results in serum. These differences were reduced after applying the ROC-calculated cut-off. We assessed the correlation between Ct values in serum and PF to explore the relationship between viral loads in the two matrices. This analysis revealed a moderate, statistically significant positive correlation between Ct values in serum and PF, suggesting a consistent relationship across matrices despite some variability. Notably, PF samples generally exhibited lower Ct values than paired serum samples, indicating higher viral loads and reinforcing the potential of PF as a more sensitive diagnostic matrix for PCV2 detection at the individual or herd level.

Other studies have also detected PCV2 more frequently in matrices other than serum. Woźniak et al. (26) detected PCV2 DNA more often in oral fluid in 46.1% (82/178) of the samples from animal farms and 64.5% (20/31) from non-vaccinated farms. For comparison, the detection rate of PCV2 in serum was 17.6% (54/307) in vaccinated farms and 63.5% (33/52) in non-vaccinated farms. Researchers point out that PCV2 genetic material in oral fluid may indicate environmental contamination. Therefore, the oral fluid captures environmental PCV2 contamination within the pen and the contribution of multiple animals, which may partly explain higher detection rates compared with serum and limit its direct interpretation as an indicator of individual infection status. Similar results were observed by Nielsen et al. (27). The authors collected 310 serum pools and oral fluid sample pairs from two herds, where 4–5 pigs were bled per pen, and where 5–33 pigs lived per pen. In the first herd, 80% of serum pools and 86% of oral fluid samples were positive for PCV2. In the second herd, 91% of serum pools and 100% of oral fluid samples were positive for PCV2. According to the author's assumptions, a slightly higher proportion of viral DNA-positive oral fluid samples compared to viral DNA-positive serum could be found due to contamination of the rope with PCV2 present in feces. Moreover, the likelihood of a positive result is probably higher when more animals are tested (4 or 5 pigs were bled versus up to 33 pigs contributing to the oral fluid sample (27)). Recently, Igriczi et al. (28) observed the highest detection rates of PCV3 in the PF samples compared to those in serum. However, the mentioned

study focused on different types of porcine circovirus, and the samples of PF were collected from a large group of animals – one plastic bag contained testicles and fluids of approximately 10 litters. In contrast, our study tested individual PF samples. In the study by Igriczi et al. (28), the overall proportion of PCV3-positive samples was 61% (59/97) in the positive farms. The detection frequencies were lower in the oral fluid samples, as the PCV3 was detected in 40% (71/176) of the samples. What is aligned with the above studies is that the lowest PCV3 detection rate was observed in the serum pools (23%; 85/371). The Ct values of the PF samples in the mentioned study were significantly lower than in the sera and oral fluid samples, with a mean value of 30.18 (28). Finally, Eddicks et al. (29) reported a high PCV2 detection rate in tissues (inguinal lymph node, spleen, thymus, lung, and myocardium) obtained from piglets crushed by their dams, with 61.6% of the 185 crushed piglets from 134 litters being PCV2 DNA-positive. However, the same research team, in earlier studies, did not detect PCV2 DNA in any of the serum samples from piglets before or after colostrum intake. All 590 pre-suckling and 581 post-suckling blood samples were PCV2 DNA-negative (30). The same results were obtained by Diste-Perez et al. (31). None of the 352 blood samples from the live-borne piglets analyzed resulted positively in the real-time PCR (31). Finally, our study aligns with the results obtained by Fan et al. (8), who found a higher detection rate of PCV2 genetic material in PF samples from pre-weaning piglets (25.7%; 118/459) compared to serum (1.2%; 5/404). Fan et al. (8) suggest that high positivity of testicular fluids indicates that infection occurs early in piglets, and the risk of PCV2-associated diseases is high after weaning. Additional support for the diagnostic relevance of testicle-derived matrices comes from a recent study by Fan et al. (29). In that study, testicles from approximately 20 litters were pooled, resulting in 415 pooled samples, of which 31.1% were positive for PCV2 DNA by real-time PCR. Unlike the present work, studies by Fan et al. (8, 32) were performed at litter-level. These findings suggest that testicular PF may be a more effective means of monitoring PCV2 than other matrices (8). The higher frequency of PCV2 DNA detection in PF samples compared with serum observed in the present study may be related to differences in matrix sensitivity and to the temporal and anatomical distribution of PCV2 early after birth. PF-positive/serum-negative pairs may therefore reflect matrix-specific detection characteristics rather than true disagreement in infection status. After birth, PCV2 replication occurs mainly in lymphoid tissues, although viral DNA has also been detected in epithelial and endothelial cells (33–35). In addition, cells of the monocytic lineage may accumulate PCV2 genetic material for prolonged periods without productive infection (36, 37), which may result in detection of viral DNA in tissue-associated matrices in the absence of detectable viremia. PCV2 DNA has previously been detected in tissues of neonatal piglets despite negative serum results (29, 30), and intermittent shedding in the male reproductive tract has also been reported (38–40). Evidence supporting the presence of PCV2 in reproductive tissues has also been reported outside commercial pig production. In a recent study conducted in southern Italy, PCV2 DNA was detected in 5 out of 37 reproductive tissue samples collected from wild boars, including testes from males and uterine tissues from females, using molecular methods (41). In addition, detection of PCV2 DNA in PF samples in this study may partly reflect environmental contamination. Although measures were taken to minimize cross-contamination during sampling, this possibility cannot be fully excluded. Conversely, serum-positive/PF-negative results may occur when viremia is present at low levels near the assay

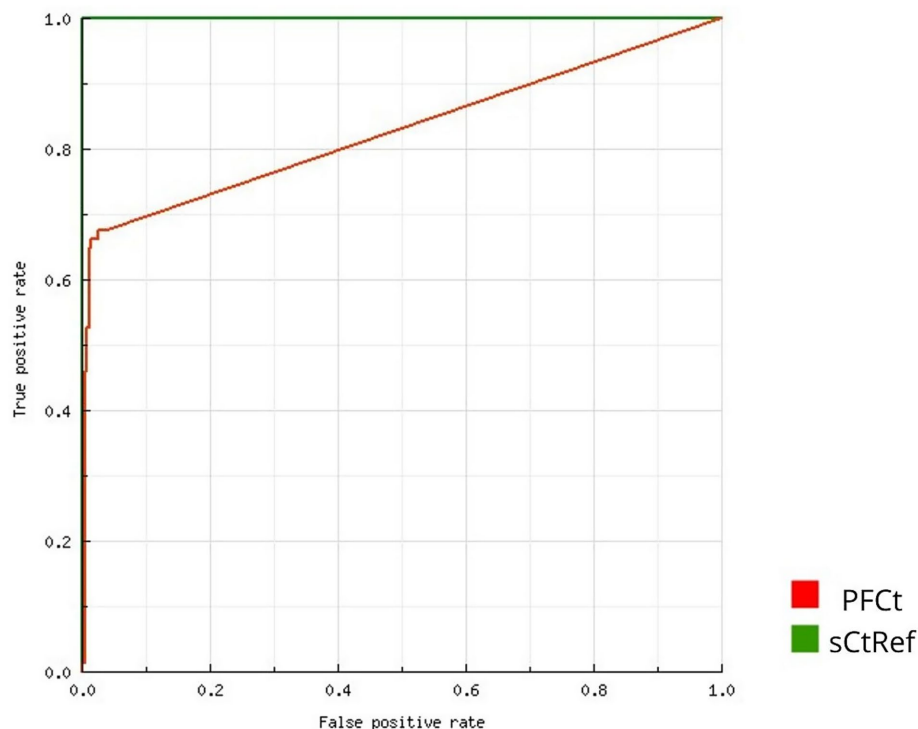


FIGURE 3

ROC curve for interpreting Ct results in PF. PFct: Processing fluid Ct. sCtRef: Male serum Ct (reference).

TABLE 6 Sensitivity (SE), specificity (SP), negative and positive predictive values (NPV, PPV), and Cohen's Kappa coefficient (K) obtained in real-time PCR for PF using the manufacturer's and ROC-calculated cut-off values.

Parameter	Manufacturer's cut-off (Ct ^a < 45)	95% CI ^b	ROC-calculated cut -off (Ct < 36.50)	95% CI
SE (%)	87.23 (41/47)	74.26–95.17	87.23 (42/47)	74.26–95.17
SP (%)	93.63 (294/314)	90.33–96.07	99.04 (311/314)	97.23–99.80
PPV (%)	67.21 (41/61)	56.95–76.06	93.33 (42/45)	81.88–97.75
NPV (%)	98.00 (294/300)	95.86–99.04	98.42 (311/316)	96.45–99.30
K	0.72	0.62–0.82	0.90	0.83–0.97

Crude numbers are shown as numerator/denominator. SE was calculated as true positives/(true positives + false negatives), SP as true negatives/(true negatives + false positives), PPV as true positives/(true positives + false positives), and NPV as true negatives/(true negatives + false negatives). All metrics were calculated for individual male PF samples using male serum as the reference method. ^aCycle threshold; ^bConfidence interval.

TABLE 7 2 × 2 contingency table comparing real-time PCR results (positive/negative) from PF and male piglet serum samples using two different cut-off values: the manufacturer-recommended cut-off and the ROC-calculated cut-off.

PF real-time PCR result	Manufacturer's cut-off		ROC-based cut-off	
	Male serum positive	Male serum negative	Male serum positive	Male serum negative
PF positive	41	20	42	3
PF negative	6	294	5	311

Serum was used as the reference method.

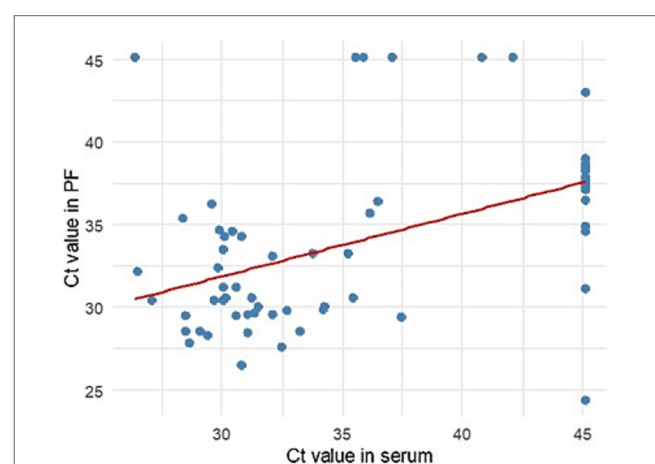


FIGURE 4

Correlation of Ct values between serum and PF. Only paired samples with detectable PCV2 DNA in at least one matrix were included in the correlation analysis.

TABLE 8 Impact of pooling and dilution (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, and 1:320) on real-time PCR detection of processing fluid (PF) samples with low, moderate and high viral load.

Dilution	Low-positive samples			Moderate-positive samples			High-positive samples		
	Ct ^a	Cut-off		Ct	Cut-off		Ct	Cut-off	
		Manufacturer's Ct < 45	Calculated Ct < 36.50		Manufacturer's Ct < 45	Calculated Ct < 36.50		Manufacturer's Ct < 45	Calculated Ct < 36.50
Ndil ^b	38.29			35.46			23.04		
1:10	–	–	–	–	–	–	26.98	+	+
1:20	–	–	–	–	–	–	27.69	+	+
1:40	–	–	–	–	–	–	28.62	+	+
1:80	–	–	–	–	–	–	31.13	+	+
1:160	–	–	–	–	–	–	31.00	+	+
1:320	–	–	–	–	–	–	33.97	+	+
Ndil	37.85			35.17			30.00		
1:10	–	–	–	37.51	+	–	32.82	+	+
1:20	–	–	–	37.80	+	–	33.15	+	+
1:40	–	–	–	38.14	+	–	35.95	+	+
1:80	–	–	–	38.77	+	–	36.10	+	+
1:160	–	–	–	0	–	–	37.11	+	–
1:320	–	–	–	0	–	–	38.19	+	–
Correctly classified		0/12	0/12		4/12	0/12		12/12	10/12

Cut-off classification is shown as “+” (positive) and “–” (negative) according to the manufacturer’s and ROC-calculated cut-off values. ^aCt – Cycle threshold; ^bNot diluted; Low-, moderate- and high-positive samples were defined based on initial Ct values as follows: low-positive, ≥36; moderate-positive, 30.01–35.99; high-positive, ≤30.

detection limit. Further studies are needed to clarify the biological basis of discordant PF and serum results. Using PF may be a convenient way to verify the presence of PCV2 in a given herd and to assess PCV2 occurrence in newborn piglets, where the virus is implicated in various pathologies. Nevertheless, the results from PF in the context of the presence of PCV2 genetic material should be interpreted with caution until further research using other techniques confirms the presence of PCV2 in testis tissue. It is important to note that PF was collected after two freeze–thaw cycles in this study, which differs from typical field practice. The second thawing was necessary to obtain sufficient fluid volume for analysis at the individual sample level. While PCV2 DNA is considered stable under frozen conditions (42), repeated freeze–thawing may compromise nucleic acid quality, and this procedural difference should be taken into account when interpreting the results.

When pooling samples and subjecting them to molecular analyses, we noted that the initial Ct of the diluted sample influences the outcome. Additionally, fewer tested samples were accurately identified as positive after implementing the ROC-calculated cut-off. In a study conducted by Lopez et al. (22), it was observed that the accuracy in correctly classifying a sample as positive was 95% within a cohort comprising 28 PRRSV-negative litters and one PRRSV-positive litter, which included 323 piglets. The authors' regression analysis model for the serially diluted processing fluid sample suggests that confining the processing fluid sampling to 30 litters or fewer (approximately 320 piglets) is anticipated to yield a 95% confidence level in detecting PRRSV RNA, even when the prevalence within piglets is minimal (22). In contrast to PRRSV, extrapolating pooled PF results to estimate herd-level epidemiological status for PCV2 warrants careful consideration, especially in scenarios characterized by low viral loads and elevated dilution ratios, where the accuracy of such inferences may be significantly compromised. In our study, none of the diluted samples in the low-positive group were correctly identified, regardless of the threshold. In the moderate-positive group, the percentage of correctly identified samples ranged from 0 to 33%, depending on the cut-off value used. Among the high-positive samples, the percentage of samples correctly identified as positive ranged from 83.33 to 100% for the ROC-calculated and standard cut-off, respectively. It is important to note that higher accuracy depends on having a low Ct value in the initial positive PF sample. The probability of PCV2 RNA detection in a pooled sample containing one sample from a PCV2-positive piglet decreases with increasing dilution. As with serological results, molecular testing of pooled PF samples will not provide reliable information regarding the PCV2 epidemiologic situation in a given herd.

This study has several limitations that should be acknowledged. PF sampling is inherently linked to routine piglet processing procedures and is therefore applicable only in production systems that perform castration. Moreover, PF provides a single early-life sampling point and does not allow longitudinal monitoring of individual animals, which limits its use as a stand-alone tool for dynamic follow-up diagnostics. Consequently, PF-based testing should be interpreted primarily as a tool for early-life and herd-level surveillance rather than repeated individual diagnostics. In addition, the biological mechanisms underlying PCV2 presence in testicular-derived PF, including tissue distribution and viral kinetics in neonatal piglets, remain incompletely understood and require further experimental investigation. Finally, serum was used as the reference matrix in this study;

however, biological compartmentalization between blood and tissue-derived fluids may inherently influence diagnostic concordance. Therefore, PF should be regarded as a complementary, context-specific diagnostic matrix rather than a universal surveillance tool. Another limitation of this study is the lack of complete farm-level metadata, including detailed PCV2 vaccination protocols, sow parity, and information on repeated farm visits. Samples were collected by field veterinarians during routine piglet processing procedures. Due to strict biosecurity measures related to African swine fever in Poland and the retrospective nature of sample submission, comprehensive production and management data could not be consistently obtained for all herds. Therefore, the potential impact of these factors on PCV2 detection in PF could not be evaluated and should be addressed in future prospective studies.

Although PF is intrinsically limited to male piglets, comparison with serum samples from females allowed to evaluate whether testicular PF-based results reflect PCV2 circulation at the population level, rather than to imply biological equivalence of male and female reproductive tissues. Lack of discernible differences between boars and gilts in the tests conducted on serum samples from both genders, and PF obtained exclusively from the testes may serve as a practical biological material for PCV2 circulation within breeding herds. A lower cut-off point should be applied to enhance the validation parameters of the ELISA and PCR tests dedicated to serum, but used for PF. It is important to note that the findings regarding the suboptimal performance of PF as a diagnostic matrix are based on results from a single commercial ELISA and PCR kit. Therefore, any recommendation for cut-off revision should be treated with caution and may not be generalizable across different test kits. Caution should be taken in interpreting the results of PF concerning the presence of PCV2 DNA, and further research is required in this field. Moreover, testing of pooled PF samples may lead to an inaccurate assessment of the herd's epidemiological situation. One potential limitation of this study is that some samples originated from the same litters, which could introduce intra-litter correlation. However, our analysis was conducted at the individual-sample level, and the aim was not to assess within-litter infection dynamics, but rather to evaluate whether PF could serve as a reliable alternative to serum for population-level PCV2 detection. Therefore, although the litter effect may exist, it was not accounted for in the statistical models, which aligns with the study's conceptual framework.

5 Conclusion

This study demonstrated that PF obtained from testicles can serve as a valuable alternative diagnostic matrix for detection of PCV2 at the herd level. Adjusting the diagnostic cut-off improved the agreement between ELISA and real-time PCR results obtained from PF and serum, suggesting that PF may provide reliable information on herd exposure status when properly validated. However, pooling PF samples can significantly underestimate the true prevalence of PCV2 due to dilution effects, especially in samples with low antibody titers or viral loads. Therefore, pooled PF testing should be interpreted with caution, and individual PF testing is preferable for accurate PCV2 detection. The findings also indicate no significant differences between results obtained from boar and gilt serum, supporting the feasibility of using testicular PF as a representative

sample for herd-level monitoring. Nevertheless, the current conclusions are based on a single commercial ELISA and PCR kit, and further validation with other diagnostic systems is necessary before routine implementation. Overall, PF provides an alternative diagnostic matrix obtained without additional sampling procedures. That may complement existing diagnostic tools for PCV2 surveillance and contribute to improving biosecurity and monitoring practices within pig production systems.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary material](#), further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The requirement of ethical approval was waived by Local Ethical Commission for Investigations on Animals in Poznan, Poznan University of Life Sciences for the studies involving animals because all samples used in this study were collected by veterinarians caring for a specific herd during routine castrations for veterinary diagnostic purposes. Individual oral informed consent was obtained from the owners for their animals' participation in this study. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent was not obtained from the owners for the participation of their animals in this study because the owners (farmers, breeders) agreed to the use of material collected from their animals for research purposes, but some of them had concerns about signing the documents. Therefore, written consents are only available for some samples.

Author contributions

HT-P: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. AD: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. MP-M: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

References

1. Turliewicz-Podbielska H, Włodarek J, Pomorska-Mól M. Non-invasive strategies for surveillance of swine viral diseases: a review. *J Vet Diagn Invest.* (2020) 32:503–12. doi: 10.1177/1040638720936616
2. Lopez WA, Angulo J, Zimmermann JJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *J Swine Health Prod.* (2018) 26:146–50.
3. Bennett B, Urzúa-Encina C, Pardo-Roa C, Ariyama N, Lecocq C, Rivera C, et al. First report and genetic characterisation of Seneca Valley virus (SVV) in Chile. *Transbound Emerg Dis.* (2022) 69:e3462–8. doi: 10.1111/tbed.14747
4. Dénes L, Ruedas-Torres I, Szilasi A, Balka G. Detection and localisation of atypical porcine pestivirus in the testicles of naturally infected, congenital tremor affected piglets. *Transbound Emerg Dis.* (2022) 69:e621–9. doi: 10.1111/tbed.14355
5. Di Bartolo I, Sabato L, Chelli E, Alborali GL, Tonni M, Monini M, et al. Pilot investigation on the presence of anti-hepatitis E virus (HEV) antibodies in piglet processing fluids. *Animals (Basel).* (2020) 10:1168. doi: 10.3390/ani10071168
6. López W, Zimmerman J, Gauger P, Harmon K, Magtoto R, Bradner L, et al. Considerations in the use of processing fluids for the detection of PRRSV RNA and antibody. *J Vet Diagn Invest.* (2022) 34:859–63. doi: 10.1177/10406387221114855

Funding

The author(s) declared that financial support was received for this work and/or its publication. The study was financed by the Narodowe Centrum Nauki (National Science Centre), project UMO-2020/37/N/NZ7/00084. The publication was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education as part of the Strategy of the Poznan University of Life Sciences for 2024–2026 in the field of improving scientific research and development work in priority research areas.

Conflict of interest

The author(s) declared that this work was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Generative AI statement

The author(s) declared that Generative AI was not used in the creation of this manuscript.

Any alternative text (alt text) provided alongside figures in this article has been generated by Frontiers with the support of artificial intelligence and reasonable efforts have been made to ensure accuracy, including review by the authors wherever possible. If you identify any issues, please contact us.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2026.1745725/full#supplementary-material>

7. Trevisan G, Angulo J, Johnson C, Jensen M, Utrera V, Marostica T, et al. Increasing the functionality of your processing fluid toolbox beyond PRRSV monitoring. *51st Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*. Atlanta, GA, USA (2020) 27–28.
8. Fan M, Bian L, Tian X, Hu Z, Wu W, Sun L, et al. Infection characteristics of porcine circovirus type 2 in different herds from intensive farms in China. *Front Vet Sci*. (2022) 10:1187753. doi: 10.3389/fvets.2023.1187753
9. Wallgren T, Larsen A, Lundeheim N, Westin R, Gunnarsson S. Implication and impact of straw provision on behaviour, lesions and pen hygiene on commercial farms rearing undocked pigs. *Appl Anim Behav Sci*. (2019) 210:26–37. doi: 10.1016/j.applanim.2018.10.013
10. 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. doi: 10.1016/j.livsci.2024.105533
11. De Briyne N, Berg C, Blaha T, Temple D. Pig castration: will the EU manage to ban pig castration by 2018? *Porc Health Manag*. (2016) 2:29. doi: 10.1186/s40813-016-0046-x
12. Bonneau M, Weiler U. Pros and cons of alternatives to piglet castration: welfare, boar taint, and other meat quality traits. *Animals (Basel)*. (2019) 9:884. doi: 10.3390/ani9110884
13. Dunshea FR, Colantoni C, Howard K, McCauley I, Jackson P, Long KA, et al. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J Anim Sci*. (2001) 79:2524–35. doi: 10.2527/2001.79102524x
14. Sutherland MA, Tucker CB. The long and short of it: a review of tail docking in farm animals. *Appl Anim Behav Sci*. (2011) 135:179–91. doi: 10.1016/j.applanim.2011.10.015
15. Patterson AR, Opriessnig T. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim Health Res Rev*. (2011) 11:217–34. doi: 10.1017/S1466252310000162
16. Segalés J, Sibila M. Revisiting porcine circovirus disease diagnostic criteria in the current porcine circovirus 2 epidemiological context. *Vet Sci*. (2022) 9:110. doi: 10.3390/vetsci9030110
17. Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res*. (2012) 164:10–9. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.007
18. Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *Vet J*. (2012) 194:151–7. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.06.031
19. Li D, Du Q, Wu B, Li J, Chang L, Zhao X, et al. Immunogenicity of adenovirus vaccines expressing the PCV2 capsid protein in pigs. *Vaccine*. (2017) 35:4722–9. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.07.031
20. Seo HW, Park C, Han K, Chae C. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2-viremic piglets after experimental PCV2 challenge. *Vet Res*. (2014) 45:13. doi: 10.1186/1297-9716-45-13
21. Vilalta C, Baker J, Sanhueza J, Murray D, Sponheim A, Alvarez J, et al. Effect of litter aggregation and pooling on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglet processing fluids. *J Vet Diagn Invest*. (2019) 31:625–8. doi: 10.1177/1040638719852999
22. López WA, Gauger PC, Harmon KM, Holtkamp DJ, Cano JP, Macedo N, et al. Probability of PRRS virus detection in pooled processing fluid samples. *Vet Microbiol*. (2021) 261:109190. doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109190
23. Madson DM, Opriessnig T. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Anim Health Res Rev*. (2011) 12:47–65. doi: 10.1017/S1466252310000053
24. Shen H, Wang C, Madson DM, Opriessnig T. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Prev Vet Med*. (2010) 97:228–36. doi: 10.1016/j.prevetmed.2010.09.020
25. Segalés J, Allan G, Chae C, Ellis J, Harding J, Krakowka S, et al. Towards a unified nomenclature for diseases associated with porcine circovirus infections. *Vet Rec*. (2025) 197:411–4. doi: 10.1002/vetr.70074
26. Woźniak A, Milewska D, Masiuk P, Stadejek T. Real-time PCR detection patterns of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Polish farms with different statuses of vaccination against PCV2. *Viruses*. (2019) 11:1135. doi: 10.3390/v11121135
27. Nielsen GB, Nielsen JP, Haugegaard J, Leth SC, Larsen LE, Kristensen CS, et al. Comparison of serum pools and oral fluid samples for detection of porcine circovirus type 2 by quantitative real-time PCR in finisher pigs. *Porc Health Manag*. (2018) 4:2. doi: 10.1186/s40813-018-0079-4
28. Igriczi B, Dénes L, Biksi I, Albert E, Révész T, Balka G. High prevalence of porcine circovirus 3 in Hungarian pig herds: results of a systematic sampling protocol. *Viruses*. (2022) 14:1219. doi: 10.3390/v14061219
29. Eddicks M, Maurer R, Deffner P, Eddicks L, Stadler W, Reese S, et al. Cross-sectional study on the prevalence of PCV types 2 and 3 DNA in suckling piglets compared to grow-finish pigs in downstream production. *Pathogens*. (2022) 11:671. doi: 10.3390/pathogens11060671
30. Eddicks M, Koeppen M, Willi S, Fux R, Reese S, Sutter G, et al. Low prevalence of porcine circovirus type 2 infections in farrowing sows and corresponding pre-suckling piglets in southern German pig farms. *Vet Microbiol*. (2016) 187:70–4. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.03.010
31. Dieste-Pérez L, Nes A, van Maanen K, Duinhof T, Tobias T. The prevalence of PCV2 viremia in newborn piglets on four endemically infected Dutch sow farms is very low. *Prev Vet Med*. (2018) 153:42–6. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.03.001
32. Fan M, Hu Z, Bian L, Wang Y, Zhang X, Li X, et al. Detection rate of porcine circoviruses in different ages and production herds of intensive pig farms in China. *Animals*. (2025) 15:1376. doi: 10.3390/ani15101376
33. Hamberg A, Ringler S, Krakowka S. A novel method for the detection of porcine circovirus type 2 replicative double stranded viral DNA and nonreplicative single stranded viral DNA in tissue sections. *J Vet Diagn Invest*. (2007) 19:135–41. doi: 10.1177/104063870701900201
34. Pérez-Martín E, Rovira A, Calsamiglia M, Mankertz A, Rodríguez F, Segalés J. A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *J Virol Methods*. (2007) 146:86–95. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.06.005
35. Sanchez RE, Meerts P, Nauwynck HJ, Ellis JA, Pensaert MB. Characteristics of porcine circovirus-2 replication in lymphoid organs of pigs inoculated in late gestation or postnatally and possible relation to clinical and pathological outcome of infection. *J Vet Diagn Invest*. (2004) 16:175–85. doi: 10.1177/104063870401600301
36. Meerts P, Misinzo G, McNeilly F, Nauwynck HJ. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch Virol*. (2005) 150:427–41. doi: 10.1007/s00705-004-0444-2
37. Vincent IE, Carrasco CP, Herrmann B, Meehan BM, Allan GM, Summerfield A, et al. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol*. (2003) 77:13288–300. doi: 10.1128/jvi.77.24.13288-13300.2003
38. Larochelle R, Bielanski A, Müller P, Magar R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol*. (2000) 38:4629–32. doi: 10.1128/JCM.38.12.4629-4632.2000
39. Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol*. (2009) 46:707–16. doi: 10.1354/vp.08-VP-0234-O-FL
40. Opriessnig T, Kuster C, Halbur PG. Demonstration of porcine circovirus type 2 in the testes and accessory sex glands of a boar. *J Swine Health Prod*. (2006) 14:42–5. doi: 10.54846/jshap/465
41. Ferrara G, Piscopo N, Pagnini U, Esposito L, Montagnaro S. Detection of selected pathogens in reproductive tissues of wild boars in the Campania region, southern Italy. *Acta Vet Scand*. (2024) 66:9. doi: 10.1186/s13028-024-00731-3
42. Wang N, Zhang Y, Lei X, Yu W, Zhan Y, Wang D, et al. Optimised conditions for preserving stability and integrity of porcine circovirus type 2 virus-like particles during long-term storage. *J Virol Methods*. (2017) 243:146–50. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.01.021