

# I NUOVI CEPPI ISOLATI DI VIRUS PRRS IN ALLEVAMENTO: COME RICONOSCERE LA LORO POSSIBILE VIRULENZA?

## NEW PRRS VIRUS STRAINS IN PIG FARMS: HOW TO IDENTIFY THEIR POSSIBLE VIRULENCE?

TONNI M., FERLAZZO G., RUGGERI J., GUARNERI F., ALBORALI G.L.,  
BONIOTTI M.B., AMADORI M.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia*

**Parole chiave:** PRRSV, patogenicità

**Key words:** PRRSV, pathogenicity

### RIASSUNTO

Il confronto tra diversi isolati di virus PRRS (PRRSV) ad oggi viene realizzato mediante il sequenziamento di alcune aree genomiche, che forniscono però limitate informazioni riguardo alla loro patogenicità. Obiettivo di questo lavoro è stato quello di classificare alcuni isolati di PRRSV sulla base della risposta immunitaria innata indotta *in vitro*. Dieci isolati di campo e due di riferimento (attenuato e ad alta patogenicità) sono stati coltivati *in vitro* e ne è stata poi testata l'interazione con cellule mononucleate di sangue periferico di suini SPF. Il pattern di citochine prodotte ha permesso di differenziare l'isolato attenuato da quelli patogeni. In particolare, l'isolato attenuato è stato l'unico a stimolare il rilascio di IL-1beta, mediatore dell'immunità innata, prodotta dalla Caspasi-1 intracitoplasmatica. Questo comportamento delinea la capacità dei ceppi patogeni di evadere la risposta del sistema immunitario innato, che invece manca in quelli attenuati. Quanto rilevato ci suggerisce che è possibile una classificazione in "immunotipi" degli isolati di PRRSV e che questo approccio potrebbe avere un risvolto pratico nel confronto tra vecchi e nuovi isolati all'interno di un allevamento.

### ABSTRACT

The comparison among different PRRSV strains is mainly performed nowadays by genome sequencing with little or no information regarding virulence. Aim of this study was the classification of some strains of PRRS virus based on the *in vitro* innate immune response. Ten field strains and two reference strains (attenuated and pathogenic) were propagated *in vitro* and later tested on PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) from SPF pigs. The cytokine response pattern allowed us to differentiate the attenuated strain from the pathogenic ones. The attenuated strain was the only one inducing an IL-1beta response, sustained by intracellular Caspase-1. This model highlights the ability of PRRSV pathogenic strains to evade the innate immune system, as opposed to the attenuated ones. Our results suggest a possible "immunotypes" classification of PRRSV strains, toward a meaningful comparison among strains isolated in pig farms.

### INTRODUZIONE

La sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) è causata da un virus RNA a catena positiva della famiglia degli Arteriviridae (PRRSV) e ad oggi è ancora ampiamente diffusa negli allevamenti italiani. L'impatto economico della malattia è proporzionale alle manifestazioni cliniche che provoca (Neumann et al., 2005), a loro volta influenzate oltre che dall'isolato virale anche dall'ospite che viene infettato (Petry et al., 2005) e

dall'ambiente di allevamento (Corzo et al., 2010). Ad oggi la caratterizzazione di un isolato virale viene realizzata mediante il sequenziamento di alcune aree del genoma (Li et al., 2012) #c , che consente il confronto di isolati diversi in base all'omologia di sequenza (Kappes and Faaberg, 2015). Infatti è stato rilevato che due isolati possono ragionevolmente essere considerati diversi se l'omologia è inferiore al 97% (Murtaugh, 2012), senza però fornire informazioni riguardo alle caratteristiche di possibile virulenza . Inoltre questo tipo di approccio non spiega la complessa relazione che esiste tra virus e ospite (Yoo et al., 2010), regolata da molte più aree genomiche di quelle solitamente sequenziate (ORF 5 e ORF 7). A questo proposito, grazie a studi *in vitro* è stata ipotizzata la presenza di “immunotipi” (Gimeno et al., 2011), ossia isolati virali con un diverso pattern di reazione nei confronti del sistema immunitario innato e quindi con una probabile ripercussione sulla virulenza osservabile *in vivo*.

Obiettivo di questo lavoro è stato elaborare una valutazione *in vitro* di alcuni isolati virali, basata sulle citochine prodotte delle cellule dell'immunità innata in risposta al virus.

## MATERIALI E METODI

### Disegno sperimentale

In questo studio sono stati presi in considerazione dieci isolati del virus della PRRS derivanti da sette allevamenti in cui è stata osservata la patologia con diverse forme cliniche (Tabella 1) ed in cui la presenza del virus è stata accertata mediante l'analisi biomolecolare su sangue o omogenato ottenuto da organi di animali deceduti. Inoltre, sono stati presi in considerazione due isolati definiti BS773 e BS114, rispettivamente ad alta patogenicità e attenuato, validati con una precedente prova sperimentale *in vivo*. Tutti gli isolati virali sono stati coltivati su macrofagi alveolari polmonari o derivanti da monociti e successivamente incubati su un substrato di cellule mononucleate di sangue periferico di suini SPF. La risposta immunitaria è stata quindi valutata tramite la misurazione delle citochine di interesse prodotte nel substrato coltivato

**Tabella 1.** Identificazione degli isolati virali con i relativi dati anamnestici e clinici. In tre casi dallo stesso focolaio sono stati identificati due isolati diversi (1,2 e 6).

**Table 1.** Virus strains identification with anamnestic and clinical data. Three strains were isolated from the same outbreak (1,2 and 6).

Identificazione dell'isolato	Data di isolamento	Materiale da cui è stato isolato	Forma clinica osservata
1 (a-b)	Dicembre 2016	Sangue	Riproduttiva
2 (a-b)	Dicembre 2016	Sangue	Respiratoria
3	Gennaio 2017	Sangue	Riproduttiva
4	Gennaio 2017	Omogenato organo	Riproduttiva e respiratoria
5	Gennaio 2017	Omogenato organo	Riproduttiva e respiratoria
6 (a-b)	Maggio 2017	Omogenato organo	Riproduttiva
7	Giugno 2017	Omogenato organo	Riproduttiva

### **Analisi di laboratorio**

La presenza del virus della PRRS negli allevamenti selezionati è stata accertata mediante analisi biomolecolare. Dai campioni di sangue o di omogenato di organo degli animali deceduti è stato estratto l'RNA mediante l'utilizzo del kit NucleoMag® Vet kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) tramite estrazione automatica con Biosprint 96 instrument (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le istruzioni del produttore. La successiva reazione di RT-PCR Real-Time è stata invece realizzata mediante il kit LSI VetMAX (TM) PRRSV EU/NA Real-Time PCR kit (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) con relative istruzioni operative.

Ogni isolato è stato risospeso in terreno RPMI 1640 + 2% siero fetale bovino (SFB) e filtrato attraverso una micro-membrana da 0,2 micron. Successivamente 0,2 ml di materiale sono stati adsorbiti su una coltura di macrofagi alveolari polmonari o da monociti ematici, precedentemente ottenuta da suini SPF (specific pathogen free), PRRS-naïve, e incubati a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. La coltura è stata osservata per i tre giorni successivi valutandone l'effetto citopatico.

Il virus ottenuto è stato poi quantificato mediante RT-PCR Real-Time. Mediante diluizioni seriali di uno standard EU PRRSV RNA ( $3.5 \times 10^5$  - 35 copie/μL) è stata allestita una curva standard per quantificare RNA di PRRSV. Ciascun ceppo è stato poi testato su colture di cellule mononucleate di sangue periferico a molteplicità 2 (2 copie genomiche / cellula) anche in questo caso prelevate da suini SPF e PRRS-naïve con l'aggiunta di una soluzione antibiotata e incubate a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 18 ore. La misurazione delle citochine di interesse è stata realizzata con i seguenti kit commerciali: TNF-alfa (Pierce Endogen, Rockford, USA), IL-1beta (Porcine IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA, R&D Systems, cat. DY681), IL-10 (Porcine IL-10 DuoSet ELISA, R&D Systems, cat. DY693B) ed IL-8 (R&D systems, DUOset cat. DY535) seguendo le istruzioni del produttore. È stata inoltre valutata la Caspasi-1 intra-citoplasmatica con un kit colorimetrico (BioVision, Catalog #K111-200). Per tutte queste componenti, è stato calcolato il rapporto di espressione rispetto al livello basale (senza lo stimolo di PRRSV).

Successivamente, per alcuni isolati è stata valutata la risposta immunitaria innata in una condizione infiammatoria, indotta artificialmente con l'aggiunta di LPS (1 μg/ml) nella coltura cellulare. In tal caso, le cellule sono state analizzate tramite citometria a flusso (Guava easyCyte HT flow cytometer e relativo software Incyte) per valutare l'espressione della caspasi-1 intracellulare.

### **Analisi statistica**

La frequenza di positività ad ogni test è stata analizzata mediante test del Chi-quadrato e la significatività statistica fissata a  $p < 0,05$  (Graph Pad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

### **RISULTATI E DISCUSSIONE**

La replicazione dei dieci isolati di PRRSV è stata elevata sia nelle colture di macrofagi alveolari polmonari che sui macrofagi da monociti di sangue periferico. Il test di stimolazione effettuato su 4-6 colture cellulari differenti per ogni isolato virale ha mostrato risultati diversi tra loro ( $p < 0,01$ ) per quanto riguarda caspasi-1, TNF-alfa e IL-10 mentre si è notata una tendenza comune ad indurre il rilascio di IL-8 (Tabella 2).

**Tabella 2.** Valutazione della risposta immunitaria innata in colture di macrofagi di sangue periferico esposti a diversi isolati di PRRSV. In tabella è riportato l'induzione (+) oppure la mancanza (-) del rilascio di citochine.

**Table 2.** Evaluation of innate immune response in PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) cultures with different PRRSV strains. The induced (+) or missing (-) cytokines are shown in the table.

<b>Citochine rilevate</b>				
<b>Isolato di PRRSV</b>	<b>IL-8</b>	<b>Caspasi-1</b>	<b>TNF-alpha</b>	<b>IL-10</b>
1-a	+	-	+	+
1-b	+	+	-	-
2-a	+	-	-	+
2-b	+	-	+	-
3	-	-	+	+
4	+	-	+	-
5	+	-	-	-
6-a	-	+	+	-
6-b	+	-	-	-
7	+	+	-	-

I pattern maggiormente rilevati sono stati quelli corrispondenti agli isolati 1a, 2a, 2b e 5 che successivamente sono stati confrontati con quelli dei due isolati di riferimento. In questo caso l'analisi è stata ancora più approfondita includendo la rilevazione di IL-1beta. Come mostrato in Tabella 3, gli isolati di riferimento mostrano un profilo di risposta immunitaria paragonabile a quello degli isolati di campo, ma con alcune sostanziali differenze. Il rilascio di IL-1beta è evidente solo nell'isolato BS114 (attenuato) mentre l'isolato BS773 (ad alta patogenicità) non stimola alcun tipo di produzione citochinica.

Sulla base dei dati precedenti gli stessi isolati di PRRSV sono stati testati *in vitro* anche all'interno di una condizione infiammatoria. In tali condizioni radicalmente diverse, il profilo di risposta si modifica nettamente. Saggiato mediante saggio citometrico, il ceppo attenuato BS114 provocava il maggiore incremento (in presenza di LPS) di leucociti vivi, positivi per caspase-1, come pure il maggiore contenimento dei fenomeni di apoptosi/necrosi. Ma soprattutto, il ceppo attenuato induceva una forte riduzione della risposta IL-1 beta, a differenza invece dei ceppi patogeni.

**Tabella 3.** Confronto della risposta immunitaria innata tra quattro isolati di campo di PRRSV e due isolati di riferimento (saggiati *in vivo*). In tabella è riportata l'induzione (+) oppure la mancanza (-) del rilascio di citochine.

**Table 3.** Comparison of innate immune response between four field PRRSV strains and two reference PRRSV strains (validated *in vivo*). The induced (+) or missing (-) cytokines are shown in the table.

Isolato di PRRSV	Citochine rilevate				
	IL-8	Caspase-1	TNF-alpha	IL-10	IL-1beta
1-b	+	+	-	-	-
2-a	+	-	-	+	-
2-b	+	-	+	-	-
5	+	-	-	-	-
BS773	-	-	-	-	-
BS114	+	-	-	-	++

I risultati di questo studio confermano quindi che la risposta immunitaria innata a PRRSV varia a seconda del tipo di isolato virale e dell'ospite infettato, come riportato da Gimeno e colleghi (Gimeno et al., 2011). Infatti, oltre agli isolati virali, aventi una differente provenienza, anche i macrofagi sono stati ottenuti da suini diversi (seppur tutti SPF e PRRS-naïve), quindi con una certa variabilità individuale. Ciononostante, è stato identificato un pattern di risposta immunitaria innata che sembrerebbe differenziare gli isolati di PRRSV con una certa patogenicità *in vivo* rispetto a quelli attenuati. In particolare, l'isolato attenuato è stato l'unico a provocare il rilascio della citochina pro-infiammatoria IL-1beta, la quale porta ad una precoce attivazione fagocitaria. In condizioni infiammatorie, in presenza di pregressa risposta IL-1 beta, il ceppo attenuato non incrementa tale risposta a differenza invece dei ceppi patogeni. Una possibile chiave di lettura dei nostri risultati è la capacità di alcuni isolati di PRRSV di evadere la risposta immunitaria innata, impedendo così l'attivazione fagocitaria iniziale che precede i meccanismi di clearance del patogeno ed i successivi fenomeni apoptotici (Costers et al., 2008). È infatti noto che il macrofago non infiammatorio consente una replicazione virale molto più elevata (Yoo et al., 2010).

Per quanto riguarda IL-10 (ad effetto anti-infiammatorio), potrebbe avere un effetto permissivo ad una replicazione virale ad alto titolo e favorire paradossalmente risposte infiammatorie in corso come descritto in altre patologie (Lauw et al., 2000). Un altro aspetto che aprirebbe un interessante campo di ricerca, sarebbe quello di integrare i dati relativi alla risposta immunitaria con quelli forniti dalle analisi genomiche.

Ciò che abbiamo visto conferma la possibilità che esistano “immunotipi” del virus della PRRS, come già ipotizzato da altri studi (Gimeno et al., 2011). È quindi possibile classificare gli isolati di campo in base al comportamento che mostrano nei confronti delle cellule dell'immunità innata, sulla base delle citochine indotte *in vitro*. Il passo immediatamente successivo è quello del confronto, sulla base di quanto sopra indicato, dei diversi ceppi circolanti inter e intra allevamento.

## CONCLUSIONI

Il diverso impatto clinico che gli isolati del virus della PRRS mostrano in campo trova un'analogia nella risposta immunitaria innata che abbiamo valutato *in vitro*. Gli isolati dotati di maggior patogenicità sembrano modulare la secrezione citochinica a loro favore, impedendo l'insorgenza di una risposta infiammatoria primaria atta a bloccare l'efficace replicazione del virus. La misurazione *in vitro* della risposta immunitaria innata potrebbe quindi aiutarci nella miglior comprensione di ciò che accade in campo. In conclusione, un approccio come quello descritto in questo lavoro potrebbe aggiungere utili dettagli per la valutazione della patogenicità di eventuali nuovi isolati di PRRSV rilevati in un allevamento.

## BIBLIOGRAFIA

1. Corzo, C. A., E. Mondaca, S. Wayne, M. Torremorell, S. Dee, P. Davies, and R. B. Morrison, 2010, Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: *Virus Res*, v. 154, p. 185-92.
2. Costers, S., D. J. Lefebvre, P. L. Delputte, and H. J. Nauwynck, 2008, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages: *Arch Virol*, v. 153, p. 1453-65.
3. Gimeno, M., L. Darwich, I. Diaz, E. de la Torre, J. Pujols, M. Martín, S. Inumaru, E. Cano, M. Domingo, M. Montoya, and E. Mateu, 2011, Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates: *Vet Res*, v. 42, p. 9.
4. Kappes, M. A., and K. S. Faaberg, 2015, PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity: *Virology*, v. 479-480, p. 475-86.
5. Lauw, F. N., D. Pajkrt, C. E. Hack, M. Kurimoto, S. J. van Deventer, and T. van der Poll, 2000, Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia: *J Immunol*, v. 165, p. 2783-9.
6. Li, J., Y. Yin, B. Guo, S. Zhou, Y. Zhang, X. Liu, and T. Sun, 2012, Sequence analysis of the NSP2, ORF5, and ORF7 genes of 11 PRRS virus isolates from China: *Virus Genes*, v. 45, p. 256-64.
7. Murtaugh, M. P., 2012, Use and interpretation of sequencing in PRRSV control programs: Allen D. Leman Swine Conference.
8. Neumann, E. J., J. B. Kliebenstein, C. D. Johnson, J. W. Mabry, E. J. Bush, A. H. Seitzinger, A. L. Green, and J. J. Zimmerman, 2005, Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States: *J Am Vet Med Assoc*, v. 227, p. 385-92.
9. Petry, D. B., J. W. Holl, J. S. Weber, A. R. Doster, F. A. Osorio, and R. K. Johnson, 2005, Biological responses to porcine respiratory and reproductive syndrome virus in pigs of two genetic populations: *J Anim Sci*, v. 83, p. 1494-502.
10. Yoo, D., C. Song, Y. Sun, Y. Du, O. Kim, and H. C. Liu, 2010, Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus: *Virus Res*, v. 154, p. 48-60.