

# **DETERMINANTI DELL' EPIDEMIOLOGIA DEL PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) IN UNA GRANDE FILIERA INTEGRATA: PUNTI DI DEBOLEZZA O OPPORTUNITÀ DI AZIONE?**

## ***PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS) EPIDEMIOLOGY IN AN INTEGRATED PIG COMPANY OF NORTHERN ITALY: A MULTILEVEL THREAT REQUIRING MULTILEVEL INTERVENTIONS***

FRANZO G.<sup>1</sup>, BARBIERATO G.<sup>1</sup>, PESENTE P.<sup>2</sup>, LEGNARDI M.<sup>1</sup>,  
TUCCIARONE C.M.<sup>1</sup>, SANDRI G.<sup>2</sup>, DRIGO M.<sup>1</sup>.

*Department of Animal Medicine, Production and Health (MAPS), University of Padua, Legnaro, Padua, Italy.; <sup>2</sup>Laboratorio Tre Valli, San Michele Extra, (VR), Italia.*

**Parole chiave:** Porcine reproductive and respiratory syndrome; Epidemiologia molecolare ; Filodinamica.

**Keywords:** Porcine reproductive and respiratory syndrome; Molecular epidemiology; Phylodynamics.

### **RIASSUNTO**

La Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) è probabilmente la malattia virale di maggior rilevanza per la suinicoltura, e i vari tentativi di eradicazione e controllo sono stati in massima parte frustrati. Al momento mancano studi che valutino oggettivamente i determinanti dell'epidemiologia molecolare dei PRRSV. Circa mille sequenze del gene ORF7, ottenute da campioni prelevati nel Nord Italia nel periodo 2004-2021 da una filiera integrata che implementava una rigida separazione fra le singole filiere produttive e un'organizzazione gerarchica del flusso di suini, sono state selezionate. Le dinamiche della popolazione nel tempo, i flussi virali entro e fra filiere produttive e il contributo di filiere o allevamenti esterni sono state stimate. Infine, la diffusione del virus sul territorio è stata ricostruita tramite un approccio filogeografico, correlandola a diversi determinanti ambientali. L'epidemiologia di PRRSV appare determinata da diversi fattori, manageriali (e.g. strategie di immunizzazione, compartimentalizzazione) e ambientali (clima, altitudine, densità della rete stradale, etc.). I piccoli allevamenti rurali sono inoltre emersi come una probabile minaccia per l'introduzione del virus nelle grandi filiere. Appare evidente come nessuna misura possa dirsi efficace individualmente e un approccio multidimensionale, concertato fra le fasi del processo produttivo e fra le diverse realtà produttive, sia fondamentale per un effettivo controllo dell'infezione.

### **ABSTRACT**

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is probably the most relevant swine disease, whose eradication and long-term control have often been frustrating. Few studies linking its molecular epidemiology to the relative risk factors are available. Approximately one thousand ORF7 sequences were obtained from strains collected between 2004 and 2021 from the largest Italian pig company, which implements strict compartmentalization among independent 3-sites pig flows. The history and dynamics of the viral population were reconstructed and linked to managerial choices. The viral

fluxes within and among independent pig flows and the contribution of other integrated pig companies and rurally risen pigs were evaluated. Finally, viral circulation in Northern Italy was reconstructed using a continuous phylogeographic approach and the impact of several environmental features on PRRSV strain persistence and spreading was assessed. The results demonstrate that PRRSV epidemiology is shaped by a multitude of managerial (e.g. immunization strategy, independent pig flows) and environmental (e.g. climate, altitude, pig density, road density, etc.) factors. Small farms emerged as a threat for larger, integrated companies. These results suggest that none of the implemented measures can be considered effective alone and a multidimensional approach, ranging from individual herd management to collaboration among different companies, is mandatory for effective infection control.

## INTRODUZIONE

La Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) è causata da due specie virali, porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 (PRRSV-1) e 2 (PRRSV-2) recentemente riclassificate come *Betaarterivirus suis* 1 and *Betaarterivirus suis* 2, genere *Betaarterivirus*, famiglia *Arteriviridae*. Il PRRSV è caratterizzato da un genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva (ssRNA(+)) di circa 15kb. Come altri ssRNA(+) presenta un alto tasso evolutivo, dovuto sia ad un elevato tasso di mutazioni ( $\sim 10^{-3}$ - $10^{-5}$  sostituzioni/sito/anno) che di ricombinazione. Indicativamente tre-quarti del genoma (ORF1a e ORF1b) codificano per proteine non strutturali, mentre la restante parte include ORFs codificanti essenzialmente per quelle strutturali (Dokland, 2010). Fra queste, la Glicoproteina 5 (GP5) e il nucleocapside (N), codificati dall'ORF5 e 7, sono particolarmente studiate e sequenziate in virtù del loro ruolo biologico e rilevanza negli studi di epidemiologia molecolare. La PRRS è considerata una delle malattie di maggior impatto economico per la suinicoltura mondiale, essendo responsabile di forme respiratorie e sistemiche, patologia riproduttiva, diminuzione delle performance produttive e mortalità, oltre ad avere un effetto sinergico con altre infezioni virali e batteriche. Infine, non devono essere trascurati i costi diretti e indiretti associati al controllo dell'infezione stessa (Chand et al., 2012). Nel corso del tempo sono stati sviluppati ed introdotti diversi vaccini e protocolli vaccinali. Tuttavia, a causa della limitata cross-protezione fra ceppi fenotipicamente diversi e della capacità del virus di eludere la risposta immunitaria, la loro efficacia si è rivelata sub-ottimale (Chae, 2021; Zhou et al., 2021). L'adozione di adeguate misure di biosicurezza è quindi di fondamentale importanza per prevenire l'introduzione e la diffusione virale in allevamento. Un'efficace implementazione di queste misure è una sfida non facile a causa della facilità di trasmissione virale, mediata da contatti diretti e indiretti, che coinvolgono la movimentazione animale, seme, fomi, via aerogena, ecc (Corzo et al., 2010). Nonostante queste evidenze, solo un limitato numero di studi ha valutato in modo oggettivo i determinanti della diffusione virale e la maggior parte dei dati disponibili sono riconducibili a report occasionali o a studi focalizzati su singole variabili. Anche in Italia, le informazioni disponibili sono parziali: la prevalenza dell'infezione è considerata elevata, anche se non sempre in presenza di segni clinici. Geneticamente, in precedenti studi, sono state identificate 2 cladi principali, entrambe parte del tipo 1, sottotipo 1, che comprendono la maggior parte dei ceppi italiani (Franzo et al., 2015). Tuttavia, i determinanti all'origine di questo scenario non sono mai stati indagati nel dettaglio. Conseguentemente, un approccio basato su un'analisi oggettiva dei dati è tutt'ora assente e molte delle scelte sono delegate all'intuito ed esperienza dei veterinari, o a limiti di natura pratica.

Il presente studio mira a ricostruire la storia e l'epidemiologia di PRRSV in Italia e

valutarne i determinanti, combinando dati di epidemiologia molecolare, management aziendale e caratteristiche ambientali tramite un modello statistico unitario, beneficiando dei recenti sviluppi nel campo della filodinamica. Un ampio spettro di metodi statistici è stato quindi applicato per valutare in modo formale e oggettivo i fattori di rischio responsabili della persistenza e diffusione di PRRSV. A tal fine si è potuto sfruttare di un dataset di oltre mille sequenze di ORF7 ottenute in un periodo di 17 anni (2004-2021) dalla maggiore filiera operante nel Nord Italia (da qui in avanti chiamata “l’Azienda”), organizzata sulla base di una rigorosa struttura gerarchica con diversi flussi di suini indipendenti gestiti con un sistema a 3-siti produttivi (i.e. scrofaie, svezzamenti e ingrassi). La conseguente identificazione di potenziali punti di controllo potrebbe fornire importanti benefici sia ai veterinari di campo che ai manager per ottimizzare e prioritizzare l’allocazione delle risorse e quindi contribuire alla salute, benessere e produttività animale.

## **MATERIALI E METODI**

### *Database delle sequenze*

Il dataset di sequenze ORF7 è stato generato durante la routinaria attività diagnostica dell’Azienda nel periodo 2004-2021. La maggior parte delle sequenze erano associate ai seguenti metadati: data di campionamento, località (latitudine e longitudine), filiera e sito produttivo (i.e. scrofaia, svezzamento o ingrasso). Le sequenze sono state allineate fra loro e con quelle dei vaccini comunemente utilizzati. Tutte le sequenze che rivelavano una forte associazione con i ceppi vaccinali sono state escluse da ulteriori analisi. La presenza di fenomeni di ricombinazione è stata testata ed eventuali stipiti ricombinanti sono stati esclusi. Il segnale temporale e filogenetico è stato valutato con TempEst e Iq-Tree (Nguyen et al., 2015; Rambaut et al., 2016).

### *Ricostruzione delle dinamiche di popolazione e del flusso virale all’interno dell’Azienda*

Il dataset è stato analizzato mediante l’approccio Bayesiano alla coalescente seriale implementato in BEAST 10.1 (Suchard et al., 2018) al fine di stimare diversi parametri di popolazione quali l’origine dell’antenato comune (time to most recent common ancestor, tMRCA), il tasso evolutivo e le dinamiche della popolazione virale. Il flusso virale fra i diversi siti del processo produttivo è stato valutato utilizzando una “discrete trait analysis (DTA)”, che stimasse la più probabile localizzazione degli antenati dei ceppi campionati, e quindi la direzionalità e l’intensità del trasferimento virale. I diversi parametri sono stati stimati tramite una catena di simulazioni Markov Chain Monte Carlo (MCMC) di 200 milioni di generazioni. La qualità e robustezza dei risultati ottenuti sono state analizzate e riassunte con Tracer 1.7. Le stime ottenute sono state riassunte in termini di media e 95% High Posterior Probability (95HPD). Similmente, è stato ottenuto un Maximum Clade Credibility tree (MCC), sulla base di tutti gli alberi generati nel corso delle simulazioni. Il software SpreadD3 è stato utilizzato per graficare il processo di diffusione virale e per valutare le connessioni fra siti produttivi caratterizzati da un adeguato supporto statistico (i.e. Bayesian Factor >10). Ulteriori statistiche riassuntive e grafici sono stati generati in R.

### *Migrazione dei ceppi fra flussi produttivi*

Come precedentemente accennato, l’Azienda è strutturata con un sistema gerarchico organizzato in flussi suini indipendenti basati su 3 siti produttivi. Più nel dettaglio, sono presenti 18 flussi indipendenti in cui ogni scrofaia fornisce suini a specifici svezzatori, tutti gestiti con un sistema “tutto pieno/tutto vuoto”. Gli svezzatori a loro

volta trasferiscono gli animali a diversi ingrassi parte della stessa catena produttiva, anch'essi operanti in un sistema "tutto pieno/tutto vuoto". I contatti diretti ed indiretti fra flussi indipendenti sono minimizzati per quanto possibile. Tuttavia, l'oggettiva valutazione dell'efficacia di questa separazione è di difficile realizzazione. A tal fine, la migrazione dei ceppi fra flussi produttivi è stata valutata tramite un'analisi di "Structured coalescent" implementata nella libreria BAYesian STRuctured coalescent Approximation (BASTA) di BEAST2 (de Maio et al., 2015). In breve, questo approccio prevede di poter considerare la popolazione virale come divisa in demi (o isole) (i.e. i flussi produttivi indipendenti), ciascuna caratterizzata da una data dimensione e connesse da un certo tasso di migrazione.

Due ulteriori analisi sono state effettuate includendo uno o due *demi* "fantasma", ossia delle popolazioni di cui si ipotizza l'esistenza ma per le quali non sono disponibili delle sequenze. Questi rappresentavano rispettivamente, nel primo caso, le restanti realtà produttive nel loro complesso e, nel secondo, le altre grandi filiere integrate e allevamenti rurali/piccole realtà produttive, separatamente. I parametri di interesse sono stati stimati come precedentemente descritto.

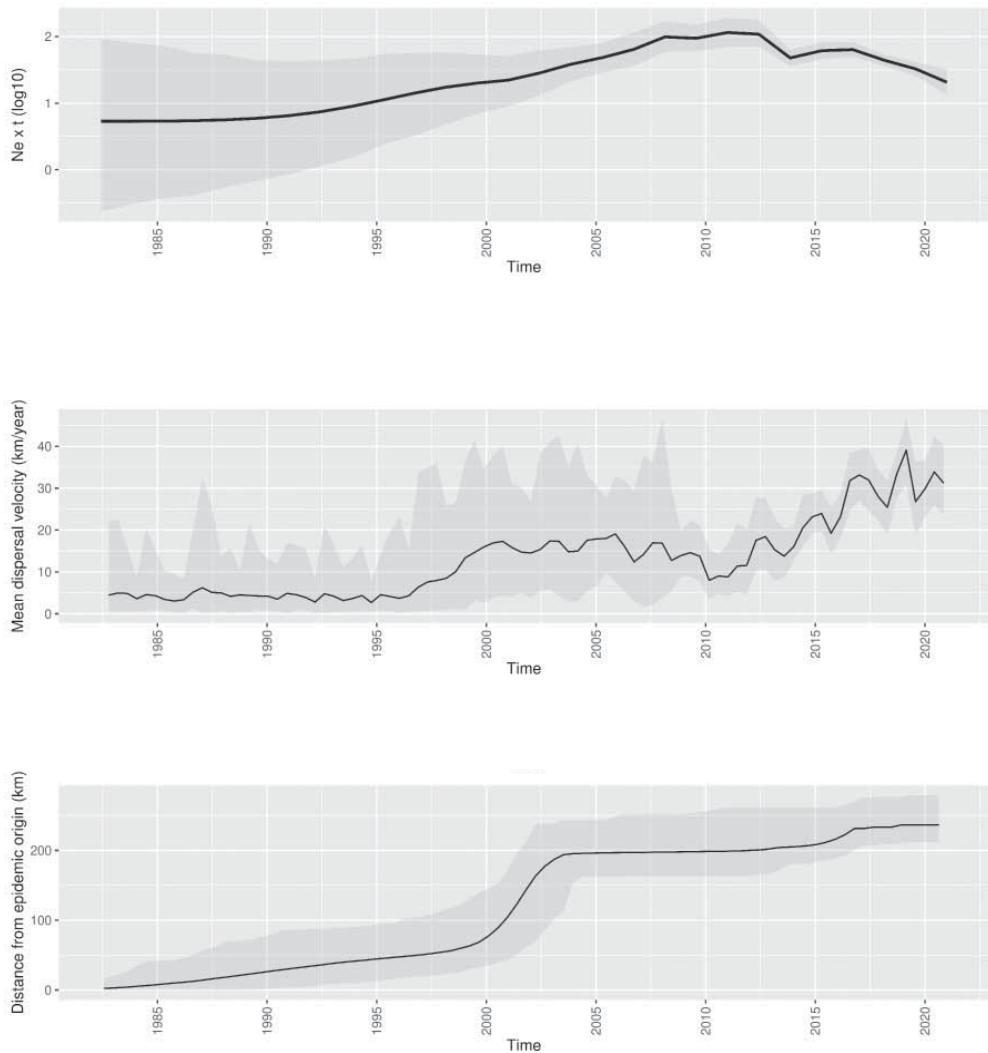
#### *Analisi filogeografica e determinanti della velocità di diffusione*

La migrazione di PRRSV sul territorio italiano dalla sua introduzione al 2021 è stata ricostruita tramite l'approccio filogeografico continuo descritto da Lemey et al. (Lemey et al., 2010). L'insieme degli alberi ottenuti durante la simulazione MCMC è stato utilizzato per valutare l'impatto di diverse variabili ambientali sulla distribuzione dei ceppi e sulla velocità di diffusione utilizzando la libreria *Seraphim* in R (Dellicour et al., 2016). In estrema sintesi, la distanza fra i siti di origine e destinazione dei singoli eventi di migrazione virale e la stima del tempo intercorso fra questi, ha permesso di ricavare la velocità di diffusione, nonché il progressivo incremento dell'areale interessato dall'espansione virale. Inoltre, sono state incluse nell'analisi le caratteristiche territoriali (e.g. variabili climatiche, utilizzo del terreno, densità degli allevamenti, della popolazione animale e umana, della rete stradale, altitudine, ecc.) al fine di indagare la loro correlazione con la velocità di diffusione virale. In altre parole, questo ha permesso di evidenziare e testare formalmente se particolari fattori ostacolassero o favorissero la migrazione di PRRSV durante il suo "passaggio" nel territorio.

## **RISULTATI**

### *Evoluzione, storia e dinamiche della PRRSV in Italia.*

L'analisi filodinamica ha evidenziato un tasso evolutivo elevato, indicativamente  $10^{-3}$  sostituzioni/sito/anno. Dopo l'introduzione dei primi ceppi in Italia, stimata negli anni 80, la popolazione virale ha conosciuto un progressivo aumento sino al 2010, quando è cominciata una marcata diminuzione che è proseguita sino alla fine dello studio, sebbene con una lieve ripresa nel 2015 (Figura 1).



**Figura 1.** Rappresentazione della variazione nelle dimensioni della popolazione virale (pannello superiore), della velocità di diffusione (pannello centrale) e della distanza dal sito di prima introduzione (pannello inferiore) nel corso del tempo. I valori medi sono rappresentati dalla linea nera mentre l'incertezza nella stima (95HPD) è rappresentata dall'area rossa.

**Figure 1.** Depiction of relative genetic diversity (upper panel), mean dispersal velocity (middle panel), and distance from the epidemic origin (lower time). Mean values are represented as a black lines, while 95HPD intervals have been displayed as red-shaded areas.

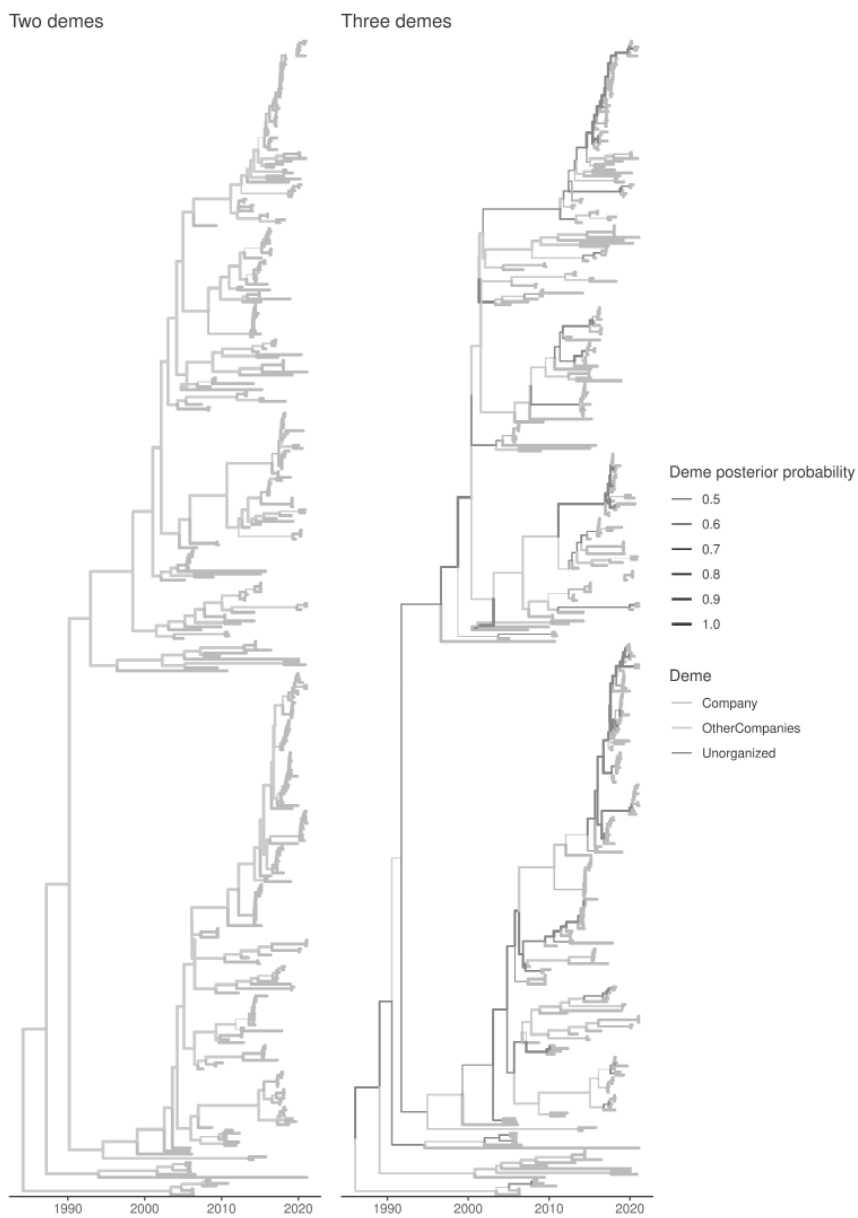
### *Migrazione dei ceppi fra stadi produttivi*

Una chiara direzionalità è stata evidenziata nel flusso virale fra le diverse fasi del processo produttivo. Più nel dettaglio, i tassi di migrazione virale dalle scrofaie agli svezzamenti e dagli svezzamenti agli ingrassi sono risultati rispettivamente 3 e 2 volte più intensi delle altre potenziali connessioni fra siti produttivi. Conseguentemente, pur con limitate eccezioni, il flusso virale seguiva quello dei suini.

### *Migrazione virale fra flussi produttivi integrati*

La stima degli eventi di migrazione virale fra flussi produttivi integrati ne ha dimostrato una sostanziale compartimentalizzazione, come evidenziato dalla tendenza delle cladi dell'albero filogenetico ad includere ceppi campionati in allevamenti appartenenti allo stesso flusso produttivo. Tuttavia, sebbene rari, alcuni eventi di migrazioni fra filiere produttive sono stati identificati e i tassi di migrazione fra queste, sebbene globalmente bassi (pur con alcune eccezioni), sono risultati essere significativamente diversi da zero.

Sorprendentemente, l'analisi del contributo di altre aziende ed allevamenti rurali nell'epidemiologia di PRRSV ha rilevato un importante ruolo di quest'ultimi. Le piccole realtà infatti sembrano albergare una popolazione virale decine di volte superiore a quelle dell'*Azienda* e di altre grandi operatori del settore. Sono inoltre risultate coinvolte nel mediare il trasferimento di ceppi di PRRSV fra diversi flussi integrati dell'*Azienda* (Figura 2).

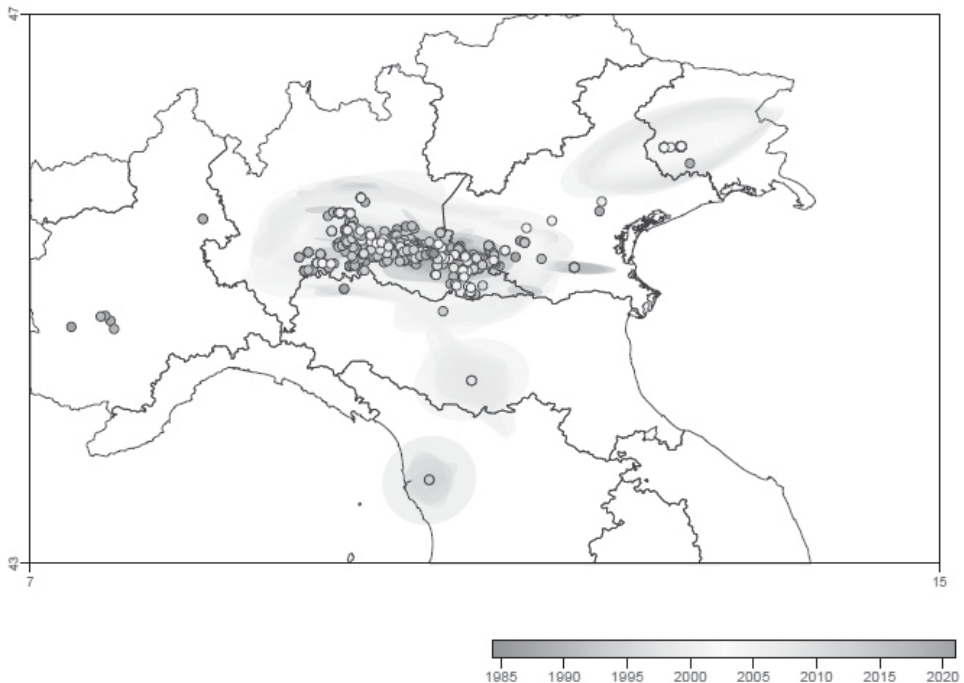


**Figura 2.** Albero filogenetico rappresentate il passaggio dei ceppi di PRRSV fra diverse realtà produttive. I colori, come riportato in legenda, definiscono il contesto in cui è stata stimata la circolazione degli antenati dei ceppi campionati mentre lo spessore dei rami dell'albero riporta la confidenza in tale stima. L'albero ricostruito includendo l'Azienda e le restanti realtà produttive, e quello in cui queste sono state suddivise in altre grandi filiere integrate e piccoli allevamenti indipendenti e rurali sono riportati rispettivamente nel pannello di sinistra e di destra.

**Figure 2.** Structured coalescent-based phylogenetic tree of the samples included in the present study. Branch colors, as from legend, mark the inferred company where the ancestral strain was circulating, while branch width represents the posterior confidence of the inference. The trees reconstructed assuming just the Company and all other Italian pig production (left figure) and the one including also a third ghost deme (i.e., Company, other integrated companies, and unorganized/rural farms) (right figure) are reported.

*Filogeografia e rilevanza delle caratteristiche del territorio*

L'analisi filogeografica suggerisce che l'introduzione e l'iniziale circolazione di PRRSV sia avvenuta nelle regioni centrali del Nord Italia (Lombardia, Emilia Romagna e Veneto), cui è seguita una diffusione centrifuga che ha coinvolto il Friuli Venezia Giulia e più tardivamente Piemonte e Toscana (Figura 3).



**Figura 3.** Ricostruzione spatio-temporale della diffusione di PRRSV nel Centro-Nord Italia. I siti di campionamento e quelli dove è stata stimata la presenza degli antenati degli stipti attuali sono rappresentati come cerchi, mentre l'area ombreggiata rappresenta l'incertezza (80%HPD) nella stima. La colorazione riflette la scala temporale in cui sono avvenute le fasi di migrazione, dalla più antica (in rosso) alla più recente (in verde).

**Figure 3.** Reconstruction of spatio-temporal dispersal history of PRRSV in Central-Northern Italy based on the maximum clade credibility (MCC) trees and 80% HPD regions estimated through the continuous phylogeographic analysis. Nodes of the MCC tree are represented as circles colored according to their time of occurrence (see color-coded scale), and 80% HPD regions were computed for successive time layers and then superimposed using the same color scale reflecting time.



La ricostruzione dell'areale geografico interessato dall'infezione ha mostrato una diffusione relativamente lenta nelle prime 2 decadi successive all'introduzione virale, cui è seguita una più rapida espansione nel periodo 2000-2005 che ha portato al massimo coinvolgimento territoriale (Figura 1). La velocità di diffusione virale ha conosciuto un costante aumento fino al 1995, cui sono seguite 2 fasi di più marcata accelerazione, dal '95 fino agli anni 2000 e dal 2010 alla fine del periodo di studio (Figura 1).

Diverse variabili ambientali sono risultate statisticamente correlate alla distribuzione di PRRSV. In particolare, si è evidenziata una minore tendenza di PRRSV a permanere in aree caratterizzate da alti valori di altitudine, densità della popolazione umana e della rete stradale. Al contrario, aree caratterizzate da un maggiore variabilità climatica nel corso dell'anno e una maggiore densità di suini favoriscono la persistenza virale. È altresì emerso come la densità della rete stradale favorisca la velocità di diffusione virale, mentre elevati valori medi della temperatura annuale la rallenti.

## **DISCUSSIONE**

Quella da PRRSV è probabilmente l'infezione più frustrante per la suinicoltura moderna. Nonostante lo sviluppo e l'applicazione di diversi vaccini e protocolli, nessuno di questi si è rivelato pienamente efficace. Notevoli sforzi sono quindi stati dedicati a migliorare le misure di biosicurezza e la gestione degli animali, con alterne fortune. L'introduzione di nuovi ceppi ha infatti spesso vanificato i successi temporaneamente ottenuti nella riduzione della prevalenza dell'infezione (Rowland and Morrison, 2012).

Il presente studio indaga la circolazione di PRRSV in Italia e i relativi determinanti, con l'obiettivo di permettere una razionalizzazione e prioritizzazione nell'allocazione delle risorse disponibili.

Sebbene l'introduzione di PRRSV in Italia sia stata stimata indicativamente negli anni '80, va tenuto a mente che tale valore si riferisce all'antenato comune dei ceppi che è stato effettivamente possibile campionare. Non è quindi da escludere che PRRSV abbia circolato in Italia anche in precedenza, coinvolgendo realtà produttive diverse dall'*Azienda*, o siano esistite varianti estinte prima dell'inizio del campionamento.

A prescindere da queste speculazioni, il successivo pattern di diffusione appare chiaro. Dopo l'iniziale introduzione nel centro del Nord Italia, PRRSV ha conosciuto una diffusione centrifuga, interessando, come atteso, aree con maggiore vocazione agricola (i.e. aree a elevata densità di suini, uso agricolo del terreno, bassa densità della popolazione umana e della rete stradale). Studi precedentemente effettuati negli USA avevano evidenziato un'analoga associazione (Arruda et al., 2017; Jara et al., 2021; Makau et al., 2021). La diffusione virale, inizialmente relativamente lenta, ha poi conosciuto una rapida espansione dalla metà degli anni '90, comportante fra le altre cose il raggiungimento dell'areale massimo. Tale incremento rispecchia l'espansione commerciale dell'*Azienda* che, negli stessi anni, ha acquisito diversi nuovi allevamenti in varie aree del Nord Italia. Il conseguente incremento nella movimentazione animale e delle distanze fra allevamenti può giustificare l'incremento del territorio interessato e della velocità di diffusione.

In modo più inatteso, dopo il raggiungimento della massima espansione, il virus ha continuato a diffondere ad una velocità comparabile, se non più elevata di quella precedente. Sebbene questo testimoni i limiti delle misure di controllo e biosicurezza attualmente adottate, il fenomeno è in parte spiegabile con l'organizzazione gerarchica dell'azienda, in cui un numero limitato di scrofaie distribuisce animali a diversi svezzatori, a loro volta fornitori di vari ingrassi localizzati in diverse regioni del territorio nazionale. La rapida diffusione del virus su lunghe distanze sarebbe quindi da attribuire all'associazione fra il flusso di suini e quello virale, come dimostrato nel presente ed in altri studi. Mentre la diffusione virale

“entro-flusso” produttivo era in parte attesa e difficilmente prevenibile, più complessa è la valutazione dell’efficacia delle misure intraprese per prevenire il passaggio di ceppi “fra-flussi produttivi”. L’analisi dell’albero filogenetico ha rivelato una chiara tendenza dei ceppi campionati in allevamenti della stessa catena produttiva a clusterizzare assieme, dimostrando la sostanziale efficacia di questa organizzazione come misura di controllo. Tuttavia, diverse eccezioni sono emerse e la stima dei tassi di migrazione è risultata statisticamente diversa da zero per diverse coppie di filiere. Appare quindi rinforzata la rilevanza della diffusione laterale di PRRSV fra flussi produttivi e la difficoltà nel limitarla, nonostante gli sforzi e le risorse dedicate (Makau et al., 2021). Una condivisione, anche parziale, dei servizi (veterinari, tecnici, autotrasporti, ecc) risulta inevitabile da un punto di vista pratico e contribuisce al rischio di introduzione di nuovi stipiti tramite la movimentazione animale e di fomite. Ciò concorda con il ruolo della densità della rete stradale, emersa come fattore favorente le velocità di diffusione virale, e conferma ulteriormente la rilevanza dei contatti indiretti come fattore di rischio di primaria importanza nell’ostacolare il controllo di PRRSV e in particolare la sua eradicazione (Makau et al., 2021). È interessante notare come, a differenza di quanto osservato nel medesimo territorio per il coronavirus aviario, la densità animale non appaia condizionare la velocità di diffusione virale. La trasmissione aerogena, sebbene dimostrata in precedenza (Otake et al., 2010), sembra quindi giocare un ruolo secondario nel contesto indagato. Se questo sia legato alla struttura dell’allevamento italiano (dimensioni medie dell’allevamento, struttura, aereazione, ecc), a fattori ambientali o a peculiarità locali, e quanto queste evidenze siano generalizzabili ad altri contesti richiederà ulteriori studi.

Al contrario, similmente a quanto riportato nel contesto avicolo, allevamenti esterni alla filiera, ed in particolare piccole realtà indipendenti e rurali, sembrano svolgere un ruolo di mediazione nel passaggio di stipiti virali da un flusso produttivo all’altro, nonché nel mantenimento di un’elevata popolazione virale, e quindi di una rilevante pressione infettante (Franzo et al., 2020). Probabilmente, le ridotte risorse manageriali, economiche e logistiche comportano una minore capacità di queste realtà nel controllare l’infezione e la sua diffusione. Di contro, il riscontro che la popolazione virale stimata nell’*Azienda* sia proporzionalmente inferiore rispetto alla quota di suini allevata, suggerisce come le misure adottate da realtà produttive altamente organizzate permettano di ridurre con maggiore efficacia la presenza e prevalenza di PRRSV.

In tal senso, a partire dal 2010 le dimensioni della popolazione virale hanno evidenziato un progressivo declino. Anche in questo caso una scelta manageriale potrebbe essere uno dei determinanti. Negli stessi anni, infatti, l’*Azienda* ha iniziato una campagna focalizzata sull’acclimatamento delle scrofette tramite esposizione forzata ai ceppi di campo, da affiancare al tradizionale uso della vaccinazione. Si può quindi ipotizzare che questo protocollo di immunizzazione intensivo abbia avuto un grosso impatto sulla circolazione virale, specie nelle prime fasi di vita e quindi nei successivi siti della catena produttiva.

Tuttavia, in considerazione del contesto epidemiologico complessivo, appare evidente che per aspirare ad un controllo realmente efficace si renda necessaria un’azione che coinvolga gli allevamenti di una vasta regione e si basi su una fattiva collaborazione fra i vari allevamenti e operatori del settore (Rowland and Morrison, 2012).

Una più intensa attività diagnostica e di sequenziamento appare fondamentale per migliorare la conoscenza del contesto epidemiologico italiano. I dati qui riportati infatti, per quanto analizzati con un robusto approccio statistico, originano da una sola azienda integrata, caratterizzata da un elevato livello gestionale. L’inferenza dei risultati ottenuti ad altri contesti, probabilmente accurata nel caso di altre grandi realtà produttive, è invece rischiosa nel caso di enti minori, in parte localizzati in altre aree quali in centro-sud Italia, e dovrebbe essere sostanziata da ulteriori evidenze empiriche.

Infine, il presente studio ha permesso di evidenziare il ruolo di diverse variabili ambientali e climatiche nel condizionare la persistenza e diffusione di PRRSV. In particolare, basse temperature e un'elevata variabilità nel corso dell'anno sono state positivamente associate alla persistenza e circolazione virale, probabilmente in quanto queste condizioni agiscono indirettamente incrementando la suscettibilità dell'ospite e/o la resistenza del virus nell'ambiente. Al contrario, un'elevata altitudine sarebbe associata ad una minor presenza di stipiti di PRRSV, giustificando la tendenza a localizzare in aree più elevate le strutture dedicate all'allevamento dei soggetti di maggior pregio.

## CONCLUSIONI

Complessivamente, i risultati di questo studio dimostrano come diversi fattori modellino l'epidemiologia di PRRSV in Italia. La gestione degli animali, ed in particolare i protocolli di immunizzazione e la separazione dei flussi animali si sono dimostrati efficaci nel limitare le dimensioni della popolazione virale. Questo si ripercuote sull'evidente vantaggio delle grandi filiere organizzate rispetto alle realtà minori, le quali possono rappresentare una minaccia per il sistema nel suo complesso. Tuttavia, una completa prevenzione della circolazione e trasmissione virale è risultata impossibile anche nel contesto dell'*Azienda* indagata e diversi altri fattori, climatici e ambientali, contribuiscono nel determinare il rischio epidemiologico complessivo. Sulla base dell'intricato network di interazioni fra diverse variabili, appare chiaro come un efficace controllo della PRRSV possa essere ricercato solamente con un approccio multidisciplinare che agisca a diversi livelli e veda la collaborazione delle varie realtà e operatori del settore.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arruda, A.G., Vilalta, C., Perez, A., Morrison, R., 2017. Land altitude, slope, and coverage as risk factors for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) outbreaks in the United States. *PLOS ONE* 12, e0172638.
2. Chae, C., 2021. Commercial prrs modified-live virus vaccines. *Vaccines*. 9, 185
3. Chand, R.J., Tribble, B.R., Rowland, R.R.R., 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Current Opinion in Virology* 2, 256–263.
4. Corzo, C.A., Mondaca, E., Wayne, S., Torremorell, M., Dee, S., Davies, P., Morrison, R.B., 2010. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research* 154, 185–192.
5. de Maio, N., Wu, C.H., O'Reilly, K.M., Wilson, D., 2015. New Routes to Phylogeography: A Bayesian Structured Coalescent Approximation. *PLoS Genetics* 11, e1005421.
6. Dellicour, S., Rose, R., Faria, N.R., Lemey, P., Pybus, O.G., 2016. SERAPHIM: Studying environmental rasters and phylogenetically informed movements. *Bioinformatics* 32, 3204–3206.
7. Dokland, T., 2010. The structural biology of PRRSV. *Virus Research* 154, 86.
8. Franzo, G., Dotto, G., Cecchinato, M., Pasotto, D., Martini, M., Drigo, M., Franzo G, Dotto G, Cecchinato M, Pasotto D, Martini M, Drigo M, 2015. Phylodynamic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Italy: Action of selective pressures and interactions between different clades. *Infection, Genetics and Evolution* 31, 149–157.
9. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Moreno, A., Legnardi, M., Massi, P., Tosi, G., Trogu, T., Ceruti, R., Pesente, P., Ortali, G., Gavazzi, L., Cecchinato, M., 2020. Phylodynamic analysis and evaluation of the balance between anthropic and environmental factors affecting IBV spreading among Italian poultry farms. *Scientific Reports* 10, 1–11.

10. Jara, M., Rasmussen, D.A., Corzo, C.A., Machado, G., 2021. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus dissemination across pig production systems in the United States. *Transboundary and Emerging Diseases* 68, 667–683.
11. Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J.J., Suchard, M.A., 2010. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Molecular Biology and Evolution* 27, 1877–1885.
12. Makau, D.N., Alkhamis, M.A., Paploski, I. a. D., Corzo, C.A., Lycett, S., VanderWaal, K., 2021. Integrating animal movements with phylogeography to model the spread of PRRSV in the USA. *Virus Evolution* 7, 1–11.
13. Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32, 268–274.
14. Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., Deen, J., 2010. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Veterinary Microbiology* 145, 198–208.
15. Rambaut, A., Lam, T.T., Max Carvalho, L., Pybus, O.G., 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution* 2, vew007.
16. Rowland, R.R.R., Morrison, R.B., 2012. Challenges and Opportunities for the Control and Elimination of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Transboundary and Emerging Diseases* 59, 55–59.
17. Suchard, M.A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D.L., Drummond, A.J., Rambaut, A., 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* 4,1 vey016.
18. Zhou, L., Ge, X., Yang, H., 2021. Porcine reproductive and respiratory syndrome modified live virus vaccine: A “leaky” vaccine with debatable efficacy and safety. *Vaccines*. 2021, 9, 362