

# **EFFETTI POSITIVI DEI BETA GLUCANI DA ALGHE SULLA REPLICAZIONE VIRALE DI PRRSV E ASFV NEI MACROFAGI ALVEOLARI POLMONARI (PAM)**

## ***POSITIVE EFFECTS OF ALGAL BETA GLUCAN ON VIRAL REPLICATION OF PRRSV AND ASFV IN PULMONARY ALVEOLAR MACROPHAGES (PAM)***

MATTUZZI S.<sup>1</sup>, DE LEON A.<sup>2</sup>, VAN HAMME V.<sup>1</sup>,  
NETO R.<sup>1</sup>, KIRWAN S.<sup>1</sup>; TAN J.<sup>2</sup>, NGUYEN T.<sup>2</sup>, THANH H.<sup>3</sup>, VU HOANG D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Kemin Europa N.V., Toekomstlaan 42, 2200 Herentals, Belgium*

<sup>2</sup> *Kemin Animal Nutrition and Health, Asia Pacific. 12 Senoko Drive, Singapore 758200*

<sup>3</sup> *Department of Biochemistry and Immunology, National Institute of Veterinary Research, 86 Truong Chinh - Dong Da - Hanoi – Vietnam*

**Parole chiave:** suinetti, Peste suina africana (PSA), PRRS, antivirali, BetaGlucani

### **ABSTRACT**

PRRS and ASF cause huge economic impact for pig producers worldwide and there is a need for additional tools to help control them. Two studies were done to determine the effect of Algal Beta Glucan in the replication of PRRSV and ASFv in PAM cells. Both studies used an in vitro macrophage model, as the virus is macrophage trophic. In the PRRS study, PAM cells were incubated for 1 hour with Algal Beta Glucan at a rate of 0.1, 1, and 10 µm/mL and then challenged with PRRSV strain MN184. The supernatant was collected at different time points (0, 12, 24, and 36 hours after infection) for the determination of viral growth by qRT-PCR. The results showed that the highest concentration of Algal Beta Glucan provided the most reduction in 24 hours and response was dose-dependent. In the ASF study, PAM cells were incubated at different times (15, 30, 60, and 120 mins) and concentrations of Algal Beta Glucan of 10 and 20 µm/mL before being challenged with 106 HAD50/ml ASFv Ha Nam strain. The supernatant was collected at different time points (30 sec, 24h, 48h, 72h, 96h, and 120h) after virus exposure for RT-PCR using OIE protocol. The overall results show suppression of PRRS viral growth as low as 0.1 µm/mL dilution of algae beta-glucan and that 50 µm/mL of Algal Beta Glucan had a significant decrease (P<0.05) of Cq value at 24 hours after ASFv exposure in both 1 and 2 hours incubation. These studies have shown the potential effects of algal beta-1,3 glucans on inhibiting or reducing ASFV and PRRS infection in PAM cells.

### **INTRODUZIONE**

Sia la peste suina africana (ASF) che la PRRS sono due dei più importanti virus che colpiscono i suini. Entrambi hanno un impatto drammatico sulla salute e sul benessere e allo stesso tempo abbiamo approcci molto diversi su come controllare le malattie che causano.

Il virus ASF è una malattia virale contagiosa che colpisce suini di tutte le età e origini. Definita una malattia virale emorragica, il virus della peste suina africana è spesso mortale per i maiali domestici infetti, causando una serie di sintomi gravi che vanno dalla febbre e dal vomito a estese emorragie interne.

Il virus della peste suina africana si replica principalmente nei sistemi linfatici e vascolari dei suini infetti. Col tempo, il virus inizia a infiltrare le cellule della milza, dei linfonodi, dei reni, del tratto gastrointestinale e respiratorio, provocando emorragie diffuse. Nei maiali domestici, il periodo di incubazione può variare da 5 a 15 giorni. Gli animali infetti possono iniziare a

rilasciare il virus più di 48 ore prima della comparsa dei sintomi, e i maiali guariti possono continuare a rilasciare il virus fino a un mese dopo la fine dei sintomi. Il virus può diffondersi attraverso tre vie principali: Contatto diretto, contatto indiretto, trasmissione vettoriale tramite artropodi, soprattutto zecche.

In generale, i segni clinici del virus della PSA si presentano in due forme: acuta e cronica. La mortalità è minore nella forma cronica, ma gli altri sintomi sono simili: febbre, diminuzione dell'appetito e perdita di peso, pelle rossa e a chiazze o lesioni cutanee, tosse e difficoltà respiratorie. Attualmente non esiste un vaccino contro il virus della PSA. Sfortunatamente, l'unico modo per evitare che il virus della PSA si diffonda ed entri nella vostra azienda, è quello di assicurare rigidi protocolli di biosicurezza.

La sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRS) è una malattia che colpisce i suini in tutto il mondo e ha un enorme impatto economico, a causa dei disturbi riproduttivi e del ritardo della crescita. Il virus sta colpendo tutte le categorie di suini, dai suinetti neonatali ai suini da ingrasso alle scrofe gravide. L'impatto finanziario in un'unità d'ingrasso è notevole, ma è anche peggiore in un allevamento da riproduzione. Al momento non esiste una cura per la malattia e la vaccinazione è lo strumento più importante per controllarla. Lo studio in vitro dell'ASFV e della PRRS di solito comporta l'uso di monociti e macrofagi suini per imitare le infezioni virali naturali. Il test di emadsorbimento (HAD) su monociti e macrofagi suini è una delle tecniche utilizzate per il rilevamento e la quantificazione dei campioni di ASFV attraverso la valutazione di un componente strutturale del virione o di un prodotto virale indotto durante l'infezione (de León, 2012).

Ci sono stati diversi studi fatti sul beta-1,3-glucano, estratto da alghe, che mostrano che il beta-1,3-glucano delle alghe innesca proprietà immunomodulanti perché è riconosciuto dai recettori della superficie cellulare, come Dectin-1 sulle cellule immunitarie dei vertebrati, come un pattern molecolare associato al patogeno (Barsanti et al., 2011; Levine et al., 2018; Barsanti e Gualtieri, 2019). Il legame del beta-1,3-glucano delle alghe ai macrofagi e alle cellule dendritiche avvia una cascata di segnali che si traduce in un aumento dei tassi di fagocitosi e presentazione dell'antigene, produzione di specie reattive dell'ossigeno e secrezione di citochine e chemochine (Levine et al., 2018; Barsanti et al., 2011). Essendo i macrofagi il sito primario di replicazione sia della PSA che della PRRS con conseguente modulazione immunitaria da parte del virus, l'obiettivo di questi studi era di valutare se il beta-1,3-glucano delle alghe fosse in grado di aiutare a diminuire la propagazione dei virus nelle cellule PAM.

## **MATERIALI E METODI**

### *Studio 1: impatto del Beta 1,3 Glucano, estratto dalle alghe, sull'infezione da virus PRRS*

Per valutare l'impatto del Beta 1,3 Glucano sull'infezione da virus PRRS dei macrofagi in vitro, è stato utilizzato un modello di macrofagi in vitro per testare l'effetto di Aleta™ contro il virus PRRS. I macrofagi alveolari suini (PAM) sono stati coltivati per una notte a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. I riceventi (pozzetti e provette) sono stati seminati con PAM a una concentrazione di 2,5x10<sup>5</sup>. Per lo studio che valuta l'impatto del Beta 1,3 Glucano contro la PRRS, le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di beta-glucano derivato dalle alghe (da 10 µm/mL a 0,01 µm/mL), diluite in un terreno specifico contenente FBS durante 1 ora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state infettate (tranne il controllo negativo) con il ceppo PRRSV MN184 per la durata di 1 ora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Il surnatante è stato raccolto in diversi momenti (0, 12, 24 e 36 ore dopo l'infezione) per determinare la crescita virale tramite qRT-PCR. La prova è stata replicata 3 volte e i risultati sono la media dei 3 replicati.

L'effetto del beta-glucano delle alghe sull'infezione dei macrofagi da parte del virus PRRS è stato valutato mediante citometria a flusso. Le cellule nelle provette sono state colorate in modo fluorescente, a 12 ore dall'infezione, con il marcatore dei macrofagi SWC3 e con l'anticorpo monoclonale SR30F per il nucleocapside intracellulare del virus PRRS (= genoma + rivestimento proteico di un virus). I campioni colorati sono stati fatti passare attraverso il citometro a flusso e i nucleocapsidi del virus sono stati misurati usando un conteggio di 10.000 cellule con selezione cellulare attivata dalla fluorescenza (FACS).

*Studio 2: effetto del beta-1,3 glucano estratto dalle alghe sulla propagazione dell'ASF*

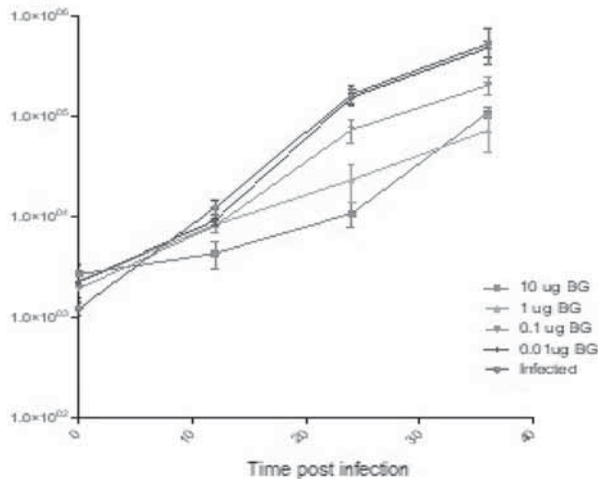
Per valutare l'effetto del beta-1,3 glucano, estratto dalle alghe, sulla propagazione dell'ASF mediante PCR in tempo reale, le cellule PAM sono state trattate con due livelli di beta-1,3 glucano estratto dalle alghe (10 e 50 microgrammi/ml) e sono state incubate per tempi diversi: 15 minuti, 30 minuti, 60 minuti e 120 minuti. Le cellule PAM trattate con il beta-1,3 glucano estratto dalle alghe sono state inoculate con l'esposizione al virus della PSA a 103 HAD50/ml. Tre campioni sono stati poi raccolti a 30 s, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h dopo l'esposizione al virus per la PCR in tempo reale per ogni tempo di esposizione al beta-1,3 glucano estratto dalle alghe. La PCR in tempo reale ha utilizzato il protocollo OIE per la quantificazione del virus della PSA. I controlli negativi e positivi sono stati inclusi nella prova, rappresentati rispettivamente da cellule PAM non trattate con beta-1,3 glucano ed esposte e non esposte al virus della PSA,.

**RISULTATI**

*Studio 1 impatto di Beta 1,3 Glucano sull'infezione da virus PRRS*

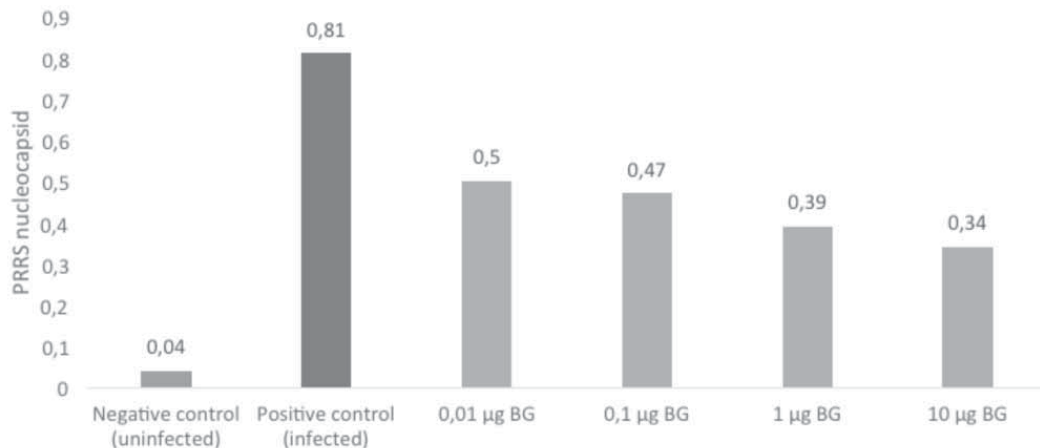
L'aggiunta di beta-glucano d'alga nel sistema di coltura ha mostrato una riduzione della crescita del virus PRRS. Le concentrazioni più alte di beta-glucano d'alga hanno fornito la maggiore riduzione a 24 ore. Una riduzione dose-dipendente della crescita virale è stata raggiunta in modo coerente ad ogni punto temporale. I risultati complessivi mostrano la soppressione della crescita virale a partire da una diluizione di 0,1 µm/mL di beta-glucano estratto dalle alghe. I risultati possono essere visti nella figura 1.

**Figura 1.** Crescita virale di PRRSV a varie diluizioni di beta-glucano da alghe per mL, media su 3 repliche ± errore standard.



Il beta-glucano estratto dalle alghe ha anche mostrato un'inibizione dipendente dalla dose dell'infezione virale dei macrofagi. L'infezione è stata soppressa alla dose più bassa di 0,01 µg di beta-glucano per mL, i risultati possono essere visti nella figura 2.

**Figura 2.** Effetto del beta-glucano delle alghe sull'infezione da PRRSV delle PAM

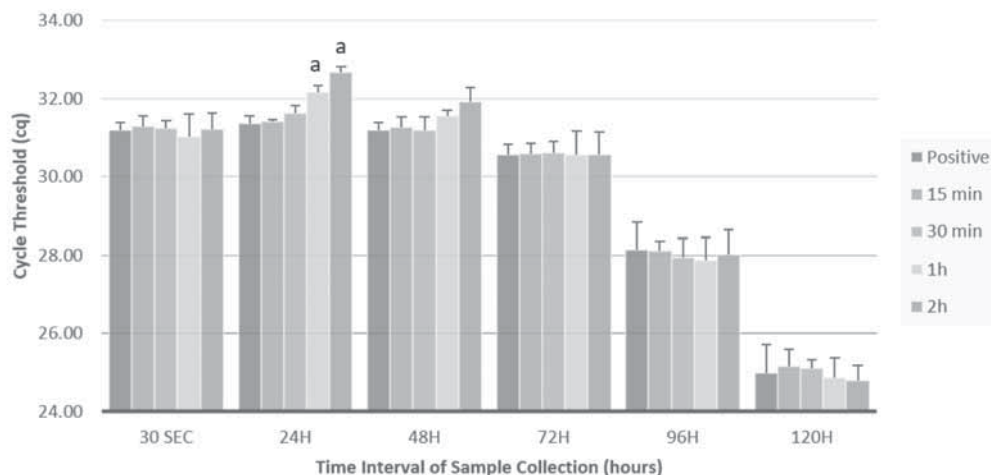


*Studio 2: effetto del Beta-1,3 Glucano estratto dalle alghe sulla propagazione dell'ASF*

I risultati hanno mostrato che l'effetto di 50 µm/mL di beta-glucano derivante da alghe hanno comportato una diminuzione significativa ( $P < 0.05$ ) del valore Cq a 24 ore, dopo l'esposizione all'ASF, sia dopo 1 che dopo 2 ore di incubazione. I risultati possono essere visti nella figura 3.

### Algae beta-1,3 glucan a 50 micrograms/ml

**Figura 3.** Effetto in vitro del Beta-1,3 Glucano algale su ASFv. Values in a row with superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )



## **DISCUSSIONE**

In entrambe le prove, Beta-1,3 Glucano estratto dalle alghe ha mostrato un'inibizione dose-dipendente dell'infezione virale e della replicazione nelle cellule PAM. La capacità di Beta-1,3 Glucano estratto dalle alghe di potenziare i meccanismi di difesa dall'infezione e contemporaneamente aumentare la secrezione di IL-10 (Russo et al., 2017) può spiegare l'azione di questi glucani nell'inibire la propagazione dei virus PRRS e ASF nelle cellule PAM. Beta-1,3 Glucani sono potenzialmente uno strumento utile per una migliore protezione degli allevamenti suini da PRRS e ASF, attraverso un ipotetico effetto diretto sulla replicazione virale.

## **CONCLUSIONE**

Questi studi hanno mostrato i potenziali effetti dei beta-1,3 glucani, estratti dalle alghe, sull'inibizione o la riduzione dell'infezione da ASFV e PRRS nelle cellule PAM.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Barsanti L, Vismara R, Passarelli V, and Gualtieri P. 2011. Paramylon ( $\beta$ -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mu-tant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *J. Appl. Phycol.* 13:59–65.
2. Barsanti L and Gualtieri P. 2019. Paramylon, a Potent Immunomodulator from WZSL Mutant of *Euglena gracilis*. *Molecules*. Sep; 24(17):3114
3. Levine R, Horst G, Tonda R, Lumpkins and Mathis G. 2018. Evaluation of the effects of feeding dried algae containing beta-1,3-glucan on broilers challenged with *Eimeria*. *Poultry Science*. 97:3494–500 - <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey227>
4. de León, P., MJ Bustos, AL Carrascosa. 2012. Laboratory methods to study African swine fever virus. *Virus Res.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.013>
5. TL-20-18183
6. SD-21-24254