

MONITORAGGIO SIEROLOGICO, VIROLOGICO E PRODUTTIVO PER IL CONTROLLO DELL'INFEZIONE DA PRRSV IN UN ALLEVAMENTO DA RIPRODUZIONE ENDEMICAMENTE INFETTO

SEROLOGICAL, VIROLOGICAL AND PRODUCTIVE MONITORING TO CONTROL PRRSV INFECTION IN AN ENDEMICALLY INFECTED BREEDING HERD

BORTOLETTO G.¹, MARTINI M.¹, NARDELLI S.², DRIGO M.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD);

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Parole chiave: PRRSV, monitoraggio, acclimatamento, sequenziamento, stabilità aziendale.
Key words: PRRSV, monitoring, acclimatization, sequencing, herd stability.

Riassunto. Obiettivo di questo studio é stato il monitoraggio della situazione epidemiologica relativa a PRRSV in un allevamento da riproduzione endemicamente infetto che basa il controllo dell'infezione sull'acclimatamento delle scrofette da rimonta in associazione ad alti standard di biosicurezza. Da aprile 2007 a marzo 2009, 24 gruppi consecutivi di scrofette sono stati testati al momento della loro entrata in produzione per verificare il loro status sierologico e virologico. Ulteriori 5 monitoraggi trasversali sono stati effettuati regolarmente per monitorare la circolazione del virus nei settori produttivi coinvolti nell'acclimatamento e la stabilità della popolazione virale. In seguito ad un focolaio di 27 aborti nel periodo ottobre-novembre 2008, è stato possibile dimostrare l'entrata di un nuovo ceppo virale attraverso il confronto della sequenza di ORF7 con quelle ottenute in precedenza. L'analisi di alcuni tra i più importanti parametri produttivi ha confermato ovviamente il calo delle performance produttive al momento del focolaio, ma anche che in un sistema di acclimatamento ben gestito il ritorno alla stabilità aziendale può essere conseguito rapidamente.

Summary. The aim of this study was to monitor the epidemiologic situation of PRRSV in an endemically infected breeding herd which controls the infection through the replacement gilts acclimatization associated with a high biosecurity policy. From April 2007 to March 2009, 24 consecutive groups of gilts were tested when introduced into the breeding unit to verify their serological and virological status. Furthermore, five transversal monitorings were carried out regularly to investigate the viral circulation in the productive units of the herd involved in the acclimatization program and to analyze the virus stability over time. After an outbreak of 27 abortions in the period October-November 2008, it was possible to demonstrate the entry of a new viral strain comparing its ORF7 sequence with previous sequences obtained in the same herd. The analysis of the most relevant production parameters confirmed the breakdown of the productive performance during the outbreak, but it demonstrated that in a well managed acclimatization system the return to herd stability can be achieved rapidly.

INTRODUZIONE

La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) è considerata da tempo uno dei maggiori problemi che affliggono la suinicoltura mondiale. In Italia la situazione

epidemiologica dell'infezione è caratterizzata da un'elevata diffusione del virus in quasi la totalità degli allevamenti, anche se spesso in assenza di sintomatologia rilevabile (Cordioli 2003) e dalla circolazione di ceppi profondamente diversi tra loro (Pesente et al. 2006). In particolare, negli allevamenti da riproduzione l'infezione endemica da PRRSV è resa possibile dal fatto che sono sempre presenti animali in diversi stadi di infezione ed immunità. In tale situazione, il primo passo per limitare la circolazione virale è dato dall'utilizzo di riproduttori che siano stati esposti all'infezione ed abbiano sviluppato un'efficace risposta immunitaria prima di entrare in produzione. Appare quindi chiaro come la rimonta delle scrofette rappresenti la chiave principale per controllare la PRRS (Batista et al. 2004): un costante acclimatemento dei riproduttori determina infatti la stabilizzazione dei segni clinici, il miglioramento dei parametri riproduttivi e la produzione di suini non viremici allo svezzamento (Zimmerman et al. 2006).

Data la grande variabilità genetica ed antigenica dei virus di campo (Batista et al. 2004), risulta inoltre indispensabile l'adozione di rigide misure di biosicurezza atte ad evitare l'entrata di PRRSV in un allevamento negativo o di nuovi stipiti virali in aziende già infette. Pertanto, in assenza di strumenti di profilassi indiretta efficaci in tutte le realtà di campo, soltanto la stretta cooperazione tra allevatori, veterinari e laboratoristi (Dee e Joo 1997) ed il regolare monitoraggio sierologico degli animali per studiare l'evoluzione dell'infezione nelle aziende (Le Potier et al. 1997) permettono di conseguire un valido controllo della PRRS.

In questo studio è stato monitorato con regolarità e per un lungo periodo di tempo lo stato sierologico, virologico e produttivo di un allevamento da riproduzione, con particolare attenzione allo status delle scrofette a fine acclimatemento. Nei campioni risultati positivi a RT-PCR si è inoltre proceduto al sequenziamento dell'ORF7, ossia il segmento genomico più conservato all'interno dei diversi stipiti virali (Meulenbergh et al. 1997, Pesente et al. 2006) e codificante per la proteina più immunogena di PRRSV (proteina N).

Il monitoraggio costante della situazione aziendale e l'analisi filogenetica delle sequenze ottenute hanno permesso di dimostrare l'effettiva endemicità dell'infezione da PRRSV nell'allevamento in presenza di un unico ceppo virale e di valutare l'entità della rottura dell'equilibrio clinico ed epidemiologico instauratosi nel tempo dovuta all'entrata di un virus molto diverso da quello circolante in azienda.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in un'azienda suinicola da riproduzione di 1550 scrofe a banda settimanale situata in Veneto, i cui suinetti vengono venduti a 30-35 kg. L'azienda è infetta da PRRS dal 1995, con due gravi focolai abortivi nel 1995 e nel 2003. La rimonta dei riproduttori è esterna ed è effettuata acquistando ogni mese 52 scrofette di 3 settimane d'età ed un peso di 6 kg da un centro genetico PRRS-free certificato. Vista la scelta di non usare strumenti di profilassi indiretta nei confronti di PRRSV, negli anni è stata messa a punto una strategia di acclimatemento che prevede un periodo sufficientemente lungo di esposizione delle scrofette allo stipite virale circolante in azienda attraverso il contatto diretto e costante con suinetti nati in azienda. L'obiettivo è quello di fecondare delle scrofette di circa 8 mesi di vita, dotate di una buona copertura anticorpale ma non più viremiche.

Per testare l'efficacia del programma di acclimatemento sono stati campionati 24 gruppi consecutivi di scrofette al momento della loro entrata in produzione, nel periodo tra aprile 2007 e marzo 2009, per un totale di 1185 animali. All'interno del periodo di studio sono stati effettuati anche 5 monitoraggi trasversali dell'allevamento con cadenza stagionale, attraverso il prelievo di sangue in suinetti dalla 2^a alla 13^a settimana di vita, per un totale

di 607 animali testati.

Tra ottobre e novembre 2008 si è verificato un focolaio di aborti in scrofe a fine gestazione, dai cui feti è stato possibile prelevare delle aliquote di liquido polmonare.

Tutti i campioni di siero e le aliquote di liquido polmonare sono stati sottoposti ad estrazione dell'RNA virale e a Real-Time RT-PCR di screening su pool di 5 campioni ciascuno. I campioni singoli dei pool positivi sono stati poi analizzati tramite RT-PCR e, quelli risultati positivi, purificati e sequenziati con modalità descritte da Pesente et al. nel 2006.

I campioni di siero delle scrofette sono stati sottoposti anche a metodica ELISA per la ricerca di anticorpi, seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

I dati produttivi sono stati ricavati interrogando il programma informatico aziendale.

ANALISI STATISTICA DEI DATI

I dati espressi come frequenza (percentuale di messa in parto, percentuale di fertilità e numero di aborti, riferito al totale delle gravidanze) sono stati analizzati mediante il test del χ^2 . Dopo aver verificato la normalità dei parametri (numero di parti, numero di suinetti svezzati, numero di svezzati/scrofa/anno, numero di nati totali/figliata, numero di nati vivi/figliata, numero di svezzati/figliata) mediante il test non parametrico di Kolmogorov-Smirnov, è stato impiegato il test T per un campione al fine di confrontare i valori produttivi ottenuti nel trimestre ottobre-dicembre 2008 contro quelli ottenuti complessivamente nei rimanenti trimestri. Un valore di $P < 0,05$ è stato considerato come soglia di significatività statistica. Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software SPSS per Windows, Rel. 12.0.0.2003 (SPSS Inc., Chicago – IL).

ANALISI FILOGENETICA DELLE SEQUENZE

Le sequenze nucleotidiche e aminoacidiche sono state allineate utilizzando il programma ClustalW incluso nel software Mega4 (Kumar et al. 2008) con cui sono stati analizzati anche gli alberi filogenetici.

RISULTATI E DISCUSSIONE

SCROFETTE A FINE ACCLIMATAMENTO

I valori di prevalenza delle scrofette sieropositive a fine acclimatemento seguono sostanzialmente lo stesso andamento dei valori di s/p espressi come media del gruppo (Fig. 1). Nella fase iniziale dello studio la strategia di acclimatemento non si è dimostrata particolarmente efficace, con risultati sierologici scarsi sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, soprattutto nei gruppi di luglio e di novembre 2007. Nei mesi successivi la situazione si è gradualmente stabilizzata ed ha permesso di raggiungere e spesso superare la soglia dell'80% di scrofette coperte immunologicamente all'entrata in produzione. Questo miglioramento è imputabile principalmente alla maggior attenzione prestata dagli allevatori nel ricambio dei suinetti adibiti ad untori e alla maggiore circolazione virale, che nei mesi più freddi è facilitata dalle basse temperature e dall'alta umidità (Albina 1997).

L'effetto della stagionalità si può facilmente notare anche confrontando i risultati virologici delle scrofette, con il 100% di pool positivi ottenuti da 3 dei 24 gruppi analizzati e viremie di minor entità ma comunque presenti in altri 6 gruppi, in concomitanza soprattutto dei mesi invernali. Per ovviare al rischio di trasmissione virale a scrofe gravide prive di anticorpi specifici, le scrofette vengono mantenute separate dal resto del branco scrofe nei reparti di fecondazione e gestazione e fatte partorire in sale parto diverse da quelle delle scrofe pluripare.

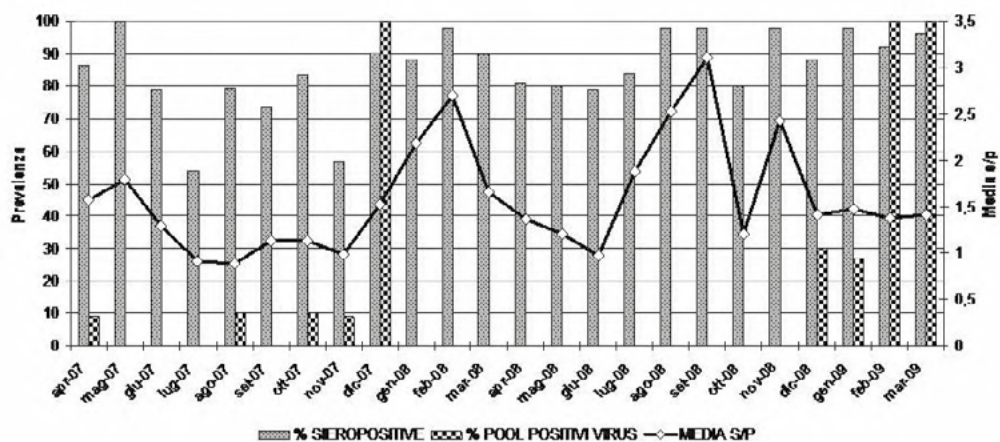


Fig. 1 Dati sierologici e virologici dei 24 gruppi di scrofette a fine acclimatamento
Fig. 1 Serological and virological data of the 24 groups of gilts at the end of acclimatization

MONITORAGGI VIROLOGICI TRASVERSALI

Una grande variabilità è stata osservata anche nella prevalenza di pool positivi per PRRSV ottenuti dai 5 monitoraggi trasversali (Tab. 1), con valori che vanno da un minimo di 13% del luglio 2008 ad un massimo di 100% del febbraio del 2009. Infatti, l'endemizzazione dell'infezione in azienda e il conseguente aumento dell'immunità di popolazione tendono a far diminuire la circolazione virale, confinandola in ristrette zone dell'allevamento. Se da una parte questo risulta positivo, tenendo lontano il virus dai reparti produttivi più critici, dall'altra comporta che nel tempo l'infezione naturale avvenga in maniera più difficoltosa anche nei settori interessati alla strategia di acclimatamento.

Tab. 1 Risultati dei 5 monitoraggi trasversali in allevamento
Tab. 1 Results of the 5 herd cross monitorings

<i>Data</i>	<i>Numero animali</i>	<i>Pool</i>	<i>Positivi</i>	<i>Negativi</i>	% positivi
30/10/2007	200	40	38	2	95
07/05/2008	115	23	17	6	74
29/07/2008	77	16	2	14	13
08/10/2008	100	20	16	4	80
17/02/2009	115	23	23	0	100
TOTALE	607	122	96	26	79

PARAMETRI PRODUTTIVI

I dati produttivi aziendali relativi ai due anni di studio sono stati suddivisi in 10 trimestri per meglio apprezzare l'evoluzione delle performance dell'allevamento nel tempo. Si è deciso di estendere il periodo analizzato fino a settembre 2009 per poter valutare in maniera più accurata l'andamento della situazione aziendale dopo un focolaio di PRRS verificatosi tra fine ottobre ed inizio novembre 2008.

Come evidenziato in Tabella 2, il trimestre ottobre-dicembre 2008 è caratterizzato da un aumento significativo del numero di aborti rispetto agli altri 9 periodi analizzati ($\chi^2=87,61$; $gdl=9$; $p<0,0000$) e da un calo altrettanto significativo di diversi parametri produttivi: numero di parti ($t=11,885$; $p<0,001$), percentuale di messa in parto ($\chi^2=91,45$; $gdl=9$; $p<0,0000$), numero di suinetti svezzati ($t=9,399$; $p<0,001$), numero di svezzati/scrofa/anno ($t=7,730$; $p<0,001$), numero di nati totali per figliata ($t=6,671$; $p<0,001$), numero di nati vivi per figliata ($t=6,311$; $p<0,001$) e numero di svezzati per figliata ($t=5,035$; $p<0,01$). La percentuale di fertilità ottenuta nel trimestre ottobre-dicembre 2008 è l'unico tra i parametri analizzati che è aumentato rispetto a quelli mediamente conseguiti negli altri trimestri. In particolare spicca il valore del 77,9% del trimestre luglio-settembre 2009 che rende il confronto particolarmente significativo dal punto di vista statistico ($\chi^2=157,30$; $gdl=9$; $p<0,0000$). Contrariamente a quanto riportato in altre esperienze di campo (Bonilauri et al. 2006) PRRSV non sembra quindi aver interessato i primi momenti della gestazione.

Il confronto tra le medie per gli stessi parametri produttivi nel periodo antecedente il focolaio (aprile 2007–settembre 2008) con quelle nel periodo che lo hanno seguito (gennaio–settembre 2009) non hanno dimostrato differenze statisticamente significative, anche se numero di parti, numero di svezzati e numero di nati vivi per figliata tendono alla significatività. Questo dimostra che l'evento infettivo ha causato dei danni evidenti solo in un periodo relativamente limitato di tempo e che la situazione aziendale è tornata alla normalità già nei primi mesi a seguire, con performance che si avvicinano a quelle pre-focolaio.

Periodo	Numero parti	% messa in parto	Numero aborti	% fertilità	Numero svezzati	Svezzati/scrofa/anno	Nati tot/figliata	Nati vivi/figliata	Svezzati/figliata
Apr-Giu '07	962	83,7	7	86,6	10758	27,53	11,96	11,74	11,26
Lug-Set '07	958	87,3	2	86,7	10560	27,30	11,76	11,45	10,69
Ott-Dic '07	925	84,1	0	91,1	9302	23,96	11,08	10,86	10,19
Gen-Mar '08	980	91,2	5	92,8	10470	26,76	11,61	11,31	10,75
Apr-Giu '08	963	91,8	3	87,3	10720	27,42	11,96	11,65	11,05
Lug-Set '08	961	88,9	3	84,1	10516	27,88	11,69	11,48	10,94
Ott-Dic '08	822	80,8	27	89,8	8269	22,46	10,85	10,55	10,10
Gen-Mar '09	877	88,3	7	87,7	9308	25,24	11,15	10,87	10,51
Apr-Giu '09	926	87,4	4	85,1	9854	25,46	11,52	11,10	10,66
Lug-Set '09	951	85,9	5	77,9	9688	24,47	11,35	10,92	10,23

Tab. 2 Analisi delle performance produttive

Tab. 2 Analysis of production performance

ANALISI FILOGENETICA

Complessivamente è stato possibile ottenere 44 sequenze complete di ORF7 di 387 basi. L'analisi filogenetica tramite l'algoritmo neighbor-joining è rappresentata in Figura 2 e rivela la presenza in allevamento di una popolazione virale stabile costituita da un solo ceppo di PRRSV con una p-distance di 1,4% di basi in 2 anni. La sequenza ottenuta dal liquido polmonare dei feti abortiti nel focolaio di ottobre–novembre 2008, chiamata 02 301008 e segnalata da una freccia, è risultata invece profondamente diversa da quelle del ceppo circolante in azienda: la p-distance nucleotidica è di 9,4-10,8% e quella aminoacidica di 10,2-13,4%, con mutazioni concentrate all'inizio ed alla fine del segmento genomico. Poiché questo virus non era mai stato ritrovato prima di allora, la sua comparsa è presumibilmente associata ad una rottura della biosicurezza aziendale (Bonilauri et al. 2006). Il fatto che esso non sia più stato rinvenuto nei monitoraggi successivi al focolaio sembra confermare il ritorno alla stabilità aziendale.

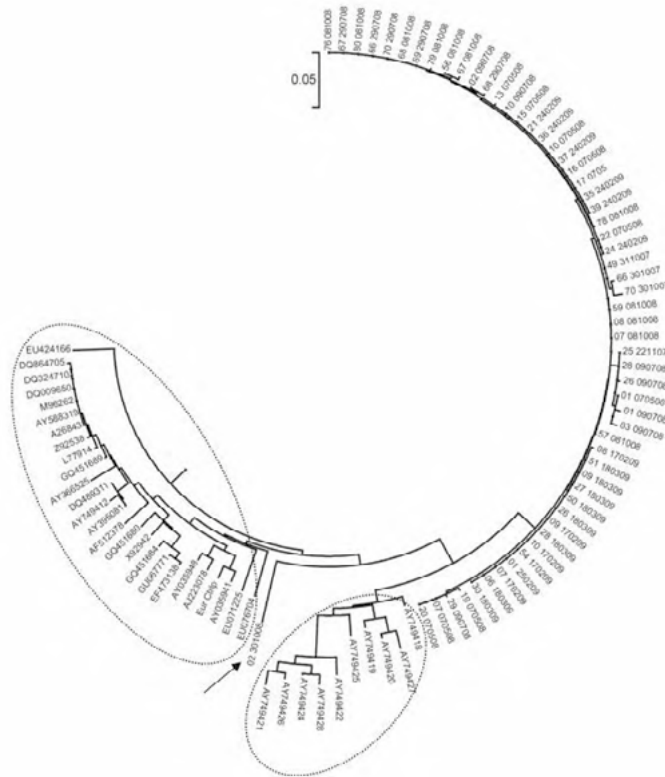


Fig. 2 Albero filogenetico delle sequenze complete di ORF7 dei ceppi virali dell'azienda oggetto di questo studio e di altre sequenze di ORF7 depositate in GenBank (racchiuse negli ovali). Le sequenze ottenute in questo studio sono state rappresentate da un numero a due cifre indicante il numero di campione e da un numero a sei cifre indicante la data di campionamento.

Fig. 2 Phylogenetic tree of the complete ORF7 sequences of the PRRSV strains of the herd of this study and of other ORF7 sequences deposited in GenBank (contained in the ovals). Sequences obtained in this study were represented by a two-digit number indicating the number of sample and a six-digit number indicating the sampling time.

CONCLUSIONI

Nel 1998 S. A. Dee definiva la stabilità di un allevamento da riproduzione infetto da PRRS come l'assenza di circolazione virale in verri, scrofe e scrofette, affermazione questa comunemente accettata e condivisa. Tuttavia, in una situazione di infezione endemica come quella che caratterizza la maggior parte degli allevamenti italiani, si può certamente completare il concetto di stabilità aziendale facendo riferimento all'assenza di segni clinici imputabili all'infezione in scrofe e suinetti e al rilevamento di una popolazione virale d'allevamento costante ed immutata nel tempo. È evidente come la stabilità aziendale sia un equilibrio estremamente fragile e dinamico, da salvaguardare e garantire attraverso l'adozione di rigide misure di biosicurezza e di strategie di controllo mirate. Questo è particolarmente vero se si considera che la grande variabilità genica degli stipti virali diffusi in campo e la scarsa cross-protezione immunitaria da essi prodotta impediscono la completa efficacia degli strumenti vaccinali finora in nostro possesso.

Come sostenuto da Pesente et al. nel 2006 e ampiamente dimostrato in questo lavoro, l'acclimatamento delle scrofette da rimonta rappresenta un valido mezzo per assicurare l'instaurarsi di una buona immunità specifica prima della loro entrata in produzione. Vista però la complessa ecologia del virus ed il dinamismo della sua circolazione dovuta alla stagionalità e alla variabilità dell'immunità di popolazione, anche le migliori strategie di acclimatamento necessitano di essere regolarmente monitorate analizzando dati sierologici, virologici e clinici dell'allevamento. Tale monitoraggio può essere effettuato attraverso controlli periodici sia delle scrofette a fine acclimatamento, sia dei suini stabulati nei reparti svezzamento e magronaggio. Ciò risulta utile per valutare regolarmente la situazione epidemiologica aziendale, monitorare l'omologia spazio-temporale dei virus circolanti e verificare l'effettiva circolazione virale nei settori meno critici.

Anche sistemi ben collaudati come quello dell'allevamento oggetto di questo studio possono incorrere in qualche rottura. In questo caso, nonostante la presenza di una buona copertura anticorpale verso PRRSV, l'ingresso di un nuovo virus dall'esterno ha potuto alterare la stabilità aziendale con la comparsa di episodi abortivi e di un forte calo delle performance riproduttive degli animali, analogamente a quanto descritto da Bonilauri nel 2006. La presenza però di una buona biosicurezza interna, costituita principalmente da un pig-flow metodico e dalla preparazione del personale aziendale, ha consentito di ristabilire l'equilibrio originario dell'azienda anche in breve tempo.

Si può quindi concludere che l'acclimatamento delle scrofette, la biosicurezza esterna ed i sistemi di biosicurezza interna concorrano sinergicamente al mantenimento della stabilità aziendale, ciascuno rimediando alle possibili *défaillance* a carico di uno dei tre fattori. A nostro avviso, il monitoraggio costante degli allevamenti e l'analisi filogenetica degli stipti di campo sono strumenti ancora troppo confinati nell'ambito della ricerca e poco applicati nella pratica. Essi invece devono essere visti come un'importante se non fondamentale ausilio per comprendere le cause delle alterazioni dell'equilibrio aziendale e per fornire agli allevatori soluzioni sempre più specifiche e strumenti di controllo sempre più validi. Per questo motivo, in accordo con l'allevatore dell'azienda oggetto di questo studio, si è deciso di continuare a monitorare anche in futuro la situazione dell'allevamento con monitoraggi trasversali regolari, prestando particolare attenzione agli aborti a fine gestazione. Inoltre, il completamento dell'analisi filogenetica delle sequenze finora ottenute attraverso il sequenziamento del segmento genomico ORF5 permetterà un'analisi più accurata dei ceppi circolanti, al fine di stabilire la loro distanza dal ceppo vaccinale europeo e di verificarne l'evoluzione a livello genomico nel tempo.

BIBLIOGRAFIA

- Albina E. (1997) "Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview". *Vet. Microbiol.* 55, 309-316.
- Batista L., Pijoan C., Dee S.A., Olin M., Molitor T.W., Joo H.S., Xiao Z., Murtaugh M.P. (2004) "Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts". *Can. J. Vet. Res.* 68, 267-273.
- Batista L., Pijoan C., Lwamba H., Johnson C.R., Murtaugh M.P. (2004) "Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico". *J. Swine Health Prod.* 12, 170-175.
- Bonilauri P., Mazzoni C., Merialdi G., Fallacara F., Barbieri I., Dottori M. (2006) "Uso del sequenziamento del ORF7 del virus della PRRS, un esempio pratico". *Atti del XXXII meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, Modena 23-24 marzo 2006*, 239-248.
- Cordioli P. (2003) "PRRS, una sindrome da conoscere a fondo". *Rivista di suinicoltura* 5, 59-60.
- Dee S.A. (1998) "A protocol for defining breeding herd stability and classifying farms according to PRRS status to identify potential intervention strategies: A summary of 200 farms". *Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July 1998*, 262.
- Dee S.A., Joo H.S. (1997) "Strategies to control PRRS: A summary of field and research experiences". *Vet. Microbiol.* 55, 347-353.
- Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. (2008) "MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences". *Bioinformatics* 2, 299-306.
- Le Potier M.F., Blanquefort P., Morvan E., Albina E. (1997) "Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the French "Pays de la Loire" region". *Vet. Microbiol.* 55, 355-360.
- Meulenberg J.J.M., Petersen den Besten A., de Kluyver E., van Nieuwstadt A., Wensvoort G., Moormann R.J.M. (1997) "Molecular characterization of Lelystad virus". *Vet. Microbiol.* 55, 197-202.
- Pesente P., Rebonato V., Sandri G., Giovanardi D., Sperati Ruffoni L., Torriani S. (2006) "Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: A showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management". *Vet. Microbiol.* 114, 214-224.
- Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M. (2006) "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus)" in: *Straw B., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. "Diseases of swine", 9^a ed., Blackwell Publishing, 387-417.*