

ACCLIMATAMENTO DELLE SCROFETTE NEI CONFRONTI DELLA PRRS; CONFRONTO DI QUATTRO DIFFERENTI METODOLOGIE PER LA VERIFICA DELLA PRESENZA DI PRRSV E ALTRI PATOGENI RESPIRATORI NEI GRUPPI DI RIMONTA

PRRS GILT ACCLIMATION ; A COMPARISON OF FOUR DIFFERENT METHODS TO SCREEN FOR PRRSV AND OTHER RESPIRATORY PATHOGENS IN DIFFERENT BATCHES

SANDRI G.¹, GIOVANARDI D.², PESENTE P.², SPERATI-RUFFONI L.²,
PERINI F.², ROSSI G.²

¹ Agricola Tre Valli, Quinto di Valpantena (VR); Gianpietro_sandri@veronesi.it

² Laboratorio Tre Valli, Corte Pellegrina

S.Martino Buonalbergo (VR) (3) Veronesi Mangimi, Quinto di Valpantena (VR)

Parole chiave: Acclimatamento scrofette, PRRSV, raschiato tonsillare, fluidi orali, lavaggio bronco-alveolare, PCR

Key words: Gilt acclimation, PRRSV, tonsil scraping, oral fluids, bronchoalveolar lavage, PCR

Riassunto: L'acclimatamento delle scrofette di rimonta nei confronti di PRRSV è un punto cruciale per un buon controllo della malattia nella scrofaia. Il lavoro descrive il processo di acclimatamento per contatto dei gruppi di scrofette di una grande scrofaia e delle procedure/analisi di controllo poste in atto per verificare la riuscita di tale programma. Per verificare che non ci siano animali portatori/eliminanti al momento dell'ingresso vero e proprio in scrofaia si è utilizzata non solo la normale sierologia ma anche PCR per PRRSV eseguite a partire da diverse matrici quali sangue, raschiato tonsillare, fluidi orali e liquido da lavaggio bronco-alveolare. Contemporaneamente le stesse matrici sono state testate anche per Influenza, *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*

Abstract: Gilt acclimation for PRRS is crucial to achieve a good control of this disease in the sow herd. This paper describes the protocol of gilt acclimation by direct contact used in large sow herd and the control protocol and diagnostic tests used. To avoid the introduction of carrier/shedder animals we used not only serology but also a PRRS-PCR performed starting from different matrix such as blood, tonsil scrapings, oral fluids and broncho-alveolar lavage fluids. At the same time starting from the same matrix we also tested for the presence of Swine Influenza, *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis*

INTRODUZIONE

L'introduzione regolare di un grande numero di scrofette in allevamento scrofe rappresenta sicuramente e per molti versi uno dei maggiori problemi che il veterinario aziendale si trova oggi ad affrontare. In particolare, dopo la comparsa della PRRS, la preparazione ed introduzione delle scrofette di rimonta è sicuramente uno dei punti (il punto) più critico nell'ambito della programmazione sanitaria nell'allevamento di scrofe. Se tralasciamo le (poche) scrofaie PRRS negative – che ovviamente devono introdurre scrofette PRRS negative – nella pratica quotidiana si possono riscontrare le più diverse situazioni in base a numero, età e frequenza di introduzione ed ovviamente in base allo stato sanitario dell'allevamento ricevente e dell'allevamento fornitore/

produttore. L'introduzione di scrofette PRRS positive, anche in allevamenti già positivi, è uno dei casi più frequenti anche se, a parere degli autori, è sicuramente tra i più "rischiosi". Infatti molto spesso non è possibile di discriminare se le scrofette di nuova introduzione siano anche *portatrici* (carrier) e/o *eliminatrici* (shedder) di PRRSV. Tuttavia anche l'introduzione di scrofette PRRS negative in scrofaia PRRS positiva rappresenta un "problema" di non facile soluzione. Molti autori sono concordi nello sconsigliare l'introduzione diretta di scrofette – quale che sia la loro età – in allevamento e suggeriscono l'adozione di una specifica procedura di isolamento/accrecimento e preparazione/introduzione. Dopo la fase di controllo o quarantena vera e propria, che deve essere fatta in strutture fisicamente e gestionalmente separate, le successive fasi possono essere organizzate e gestite in maniera differente in base alla disponibilità e di ambienti e all'organizzazione delle varie aziende. Lo scopo rimane comunque quello di fornire alle scrofette (PRRS negative) in entrata un qualche tipo di immunità nei confronti di PRRSV. Tale immunità può essere più semplicemente stimolata mediante vaccinazione con vaccini vivi-modificati e/o spenti eventualmente in combinazione. Il grado di protezione fornito dal solo programma vaccinale è perlomeno limitato per cui molto spesso si ricorre a programmi di "immunizzazione naturale" che prevedono "l'esposizione" delle scrofette al PRRSV specifico/omologo della scrofaia di destinazione. Il punto cruciale rimane comunque quello di evitare l'introduzione di scrofette di rimonta portatrici e/o eliminatrici di PRRSV per cui è necessaria una procedura di controllo pre introduzione. A tale scopo la sola sierologia è ampiamente insufficiente ed è meglio affiancare anche altre tecniche diagnostiche quali la PCR. La PCR per PRRS oltre che sull'emosiero può essere effettuata su diverse matrici/tessuti di più o meno facile ottenimento. A tale fine negli ultimi anni sono state sperimentate e valutate diverse tecniche. Il raschiato tonsillare (oro-faringeo) ed il lavaggio bronco-alveolare si sono dimostrati particolarmente "sensibili" ma la tecnica di raccolta è sicuramente indaginosa e non applicabile su larga scala. I fluidi orali raccolti mediante apposite corde appese nei box che vengono succhiate dalle scrofette possono rappresentare una valida alternativa per controllare anche grandi numeri e non solo per PRRSV.

MATERIALI E METODI.

La scrofaia oggetto di questo lavoro è una scrofaia di notevoli dimensioni – PRRS positiva – che introduce un nuovo gruppo di scrofette di rimonta ogni quattro settimane ovvero 13 gruppi l'anno. Ogni gruppo di rimonta consiste di ca. 280 scrofette di 21-24 giorni di vita provenienti da un moltiplicatore esterno PRRS negativo. Le giovani scrofette sono ospitate in una *fase di quarantena/svezzamento* separata dalla scrofaia, composta da tre ambienti di svezzamento indipendenti che lavorano TP/TV, dove permangono per circa 50-60 giorni. Successivamente vengono trasferite in una vicina *fase di accrecimento* che consiste di due ambienti separati ma gestiti a flusso continuo; normalmente sono sempre presenti almeno tre diversi gruppi/età di animali che vanno dagli 80 ai 180 giorni di vita circa. In questa fase oltre alle vaccinazioni specifiche si cerca di mantenere sempre una certa circolazione di PRRSV specifico di allevamento eventualmente ricorrendo all'introduzione di suinetti svezzati. Al compimento del sesto mese di vita circa le scrofette vengono finalmente introdotte in un apposito reparto della scrofaia dove vengono completate le vaccinazioni ed iniziato il programma di stimolazione e ricerca calori. Per verificare lo status del programma di acclimatamento scrofette a novembre 2011 sono stati controllati tre gruppi di scrofette di varie età come specificato nella seguente tabella.

Tabella 1. Gruppi di scrofette sottoposte ad indagine e relativa età e fase di allevamento
Table 1. Groups gilts undergoing testing and their relative age and place

<i>gruppo</i>	<i>età</i>	<i>fase</i>
C 78 (lug. 11)	110 gg	Entrate in Accrescimento/acclimatamento da 4 settimane
C 76 (mag.11)	170 gg	In Accrescimento/acclimatamento da ca.14 settimane
C 74 (mar.11)	230 gg	Spostate nella Stimolazione della scrofaia da ca. 8 settimane

Da ciascuno di questi tre gruppi di scrofette sono stati scelti a caso 3 box dove sono state appese delle corde in canapa della lunghezza di ca. 30-40 cm. affinché potessero essere succhiate dalle scrofette stesse si potessero successivamente raccogliere i fluidi orali (saliva). Le corde sono rimaste a disposizione delle scrofette per 30 min. circa e successivamente raccolte in appositi sacchetti sterili. Una volta giunte in laboratorio da ciascun gruppo di corde si sono raccolti, mediante strizzatura, 3-5 ml. di saliva che sono stati successivamente sottoposti alle analisi di seguito descritte. Contemporaneamente, sempre dagli stessi 3 box dei tre gruppi di scrofette, sono state scelte a caso nove animali. Ciascuna delle nove scrofette è stata adeguatamente immobilizzata e sottoposta a prelievo di sangue. In successione, con utilizzo di apposito morso apribocca si è provveduto a effettuare il raschiato della tonsilla palatina e il lavaggio bronco-alveolare. Per ottenere il raschiato è stato utilizzato un apposito cucchiaino Cuzzi dal quale è stato poi prelevato un frustolo di tessuto tonsillare mediante tampone rayon (Copan Italia). Tra un animale ed il successivo il cucchiaino veniva lavato e sterilizzato a fuoco utilizzando un apposito becco flambatore. I tamponi refrigerati sono stati consegnati al laboratorio nell'arco di poche ore e sottoposti agli esami di seguito descritti. Per effettuare il lavaggio bronco-alveolare è stata scelta la tecnica con accesso al polmone per via orale (Scollo et al. 2011) utilizzando sonde monouso della lunghezza di circa 90 cm. Una volta raggiunte le vie aeree profonde sono stati introdotti 15 ml di soluzione fisiologica isotonica che è stata successivamente aspirata utilizzando una siringa sterile monouso da 20 ml. Il liquido venuto a contatto col parenchima polmonare o BALF – solitamente di un volume variabile da 2 a 6 ml – veniva raccolto in provette sterili, refrigerato ed inviato anch'esso in laboratorio per essere sottoposto agli esami descritti nella seguente tabella.

Tabella 2. Matrici prelevate ed elenco degli esami di laboratorio
Tab.2. Specimen obtained and list of laboratory exams performed

	C 78	C 76	C 74
Sangue	Sierologia + PCR per PRRS	Sierologia + PCR per PRRS	Sierologia + PCR per PRRS
Raschiato tonsillare	PCR per PRRS e FLU	PCR per PRRS e FLU	PCR per PRRS e FLU
Fluidi orali (saliva)	PCR per PRRS e FLU	PCR per PRRS e FLU	PCR per PRRS e FLU
BALF	PCR per PRRS e FLU PCR per M.Hyo e M.hyorinis	PCR per PRRS e FLU PCR per M.Hyo e M.hyorinis	PCR per PRRS e FLU PCR per M.Hyo e M.hyorinis

Per la sierologia PRRS è stato utilizzato il kit IDEXX PRRS X3.

Estrazione di RNA virale e del DNA di Mycoplasmi

L'RNA è stato estratto dai pool di sieri, dei raschiati oro-faringei, dei fluidi orali e dai pool di lavaggi bronchiali, utilizzando l'RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germania) in accordo con le istruzioni del produttore. Da raschiati oro-faringei e dai lavaggi bronchiali è stato anche estratto il DNA tramite l'utilizzo del kit DNeasy Tissue kit (Qiagen).

Ricerca PRRSv e Influenza A

Per la ricerca del virus della PRRS è stata utilizzata una Multiplex one-step RT-PCR, che amplifica una regione comprendente una parte dell'ORF6 e l'intero ORF7. Sono stati utilizzati i primer P72 (Guarino *et al.*; 1999), Olek-F (Oleksiewicz *et al.*; 1998), EU6-343-F e EU7-340-R (Revilla-Fernandez *et al.*; 2005). Per la ricerca del virus dell'Influenza A è stata utilizzata una One-step RT-PCR, che amplifica una regione codificante per la proteina della matrice del virus. I primer adoperati sono Flu-F e Flu-R (Fouchier R.A. *et al.*; 2000.). Per entrambe le analisi è stato utilizzato il kit "Super Script One-step RT-PCR con platinum Taq" (Invitrogen, USA).

Analisi sequenze genica di PRRSv

I campioni risultati positivi al virus della PRRS sono stati tipizzati tramite analisi della sequenze genica. I prodotti di RT-PCR sono stati inviati al centro BMR-Genomics (Padova) per il sequenziamento e successivamente è stato eseguito uno studio epidemiologico con l'ausilio dei pacchetti informatici GENEDOC version 2.7 e Phylip versione 3.69. L'albero filogenetico ottenuto è stato visualizzato tramite il software Treeview versione 1.6.6.

Ricerca Mycoplasma hyopneumoniae e M. hyorhinis

Per la ricerca di *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* è stata utilizzata una Multiplex PCR. Le coppie di primers utilizzati sono Sp37- Asp37 (Caron *et al.*, 2000) e M.hyop1-F –M.hyop2-R (Calsamiglia M, *et al.*, 1999). La mix di reazione utilizzata è quella contenuta nel kit Multiplex PCR KIT (Qiagen).

RISULTATI

Di seguito vengono elencati i risultati dei vari esami di laboratorio effettuati ma occorre notare che nel gruppo C 74 mancano i risultati della sierologia di una delle nove scrofette prelevate perché la provetta è andata accidentalmente distrutta durante il trasporto/manipolazione.

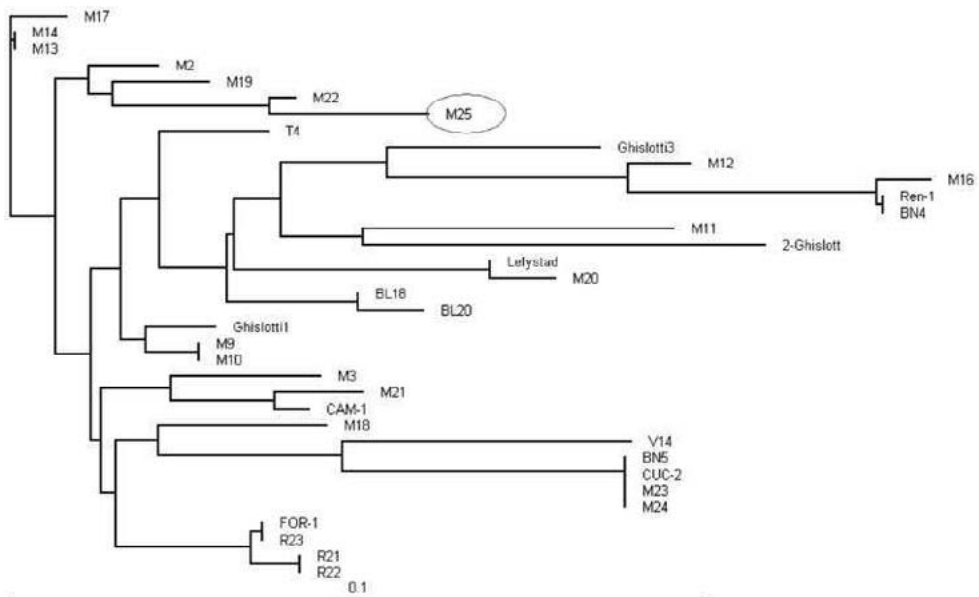
Tabella 3. Esiti degli esami di laboratorio

Table 3. Laboratory results

	C 78	C 76	C 74
Sangue	PRRS-PCR neg. Serol. 5/9 pos. (s/p 0,68)	PRRS-PCR neg. Serol. 9/9 pos. (s/p 2,60)	PRRS-PCR neg. Serol. 6/8 pos. (s/p 1,16)
Raschiato tonsillare	FLU-PCR neg. PRRS-PCR neg.	FLU-PCR neg. PRRS-PCR neg.	FLU-PCR neg. PRRS-PCR neg.
Fluidi orali (saliva)	FLU-PCR neg. PRRS-PCR neg.	FLU-PCR neg. PRRS-PCR neg.	FLU-PCR neg. PRRS-PCR neg.
BALF	FLU-PCR neg. M.HYO-PCR pos.1/9 M.hyorinis-PCR neg. PRRS-PCR pos.1/9	FLU-PCR neg. M.HYO-PCR pos.2/9 M.hyorinis-PCR neg. PRRS-PCR neg.	FLU-PCR neg. M.HYO-PCR neg. M.hyorinis-PCR neg. PRRS-PCR neg.

Al fine di ridurre i costi di analisi i campioni di sangue, raschiato tonsillare e fluidi orali prelevati dai tre gruppi di scrofette prese in considerazione sono stati raccolti in pool di tre per tutte le indagini di biologia molecolare. Solamente i BALF dei tre gruppi sono stati sottoposti a PCR individuale per tutte le ricerche (FLU, M.hyo, M.hyorinis e PRRSV). Tutti gli esami sierologici sono stati eseguiti individualmente. Come ci si poteva aspettare, nonostante il gruppo delle scrofette più giovani avesse avuto un'episodio influenzale ad inizio settembre 2011 (SIV-A H1N1) non è stata riscontrata nessuna positività in PCR per quanto riguarda l'influenza (FLU). Anche per M.hyorinis non è stato possibile riscontrare nessuna positività in alcuno dei pool esaminati. M.hyopneumonie è stato riscontrato in uno solo dei nove campioni di BALF del gruppo di scrofette più giovani (C78 – lug11) e in due su nove campioni del gruppo mediano (C76- mag11). Per quanto riguarda PRRS tutti e tre i gruppi sono risultati sierologicamente positivi sebbene con prevalenze diverse e diversi valori medi di s/p (vedi Tab.3). Tutti i pool di emosieri sono risultati negativi per PRRSV in PCR, così come sono risultati “curiosamente” negativi anche i raschiati tonsillari (per esperienza personale è solitamente la matrice più sensibile per il ritrovamento di PRRSV) ed i fluidi orali (saliva). Solamente uno dei nove BALF del gruppo delle scrofette più giovani è risultato positivo alla PCR per PRRSV. La successiva sequenza del genoma ha rivelato una omologia del 97% con un ceppo trovato in corso di un precedente episodio di PRRS verificatosi in scrofaia a febbraio 2011 e una bassissima omologia (<90%) col ceppo vaccinale utilizzato.

Fig.1 Albero filogenetico con ceppo M25 isolato da BALF
Fig.1 Phylogenetic tree including strain M25 obtained from BALF



DISCUSSIONE

Il numero di campioni prelevati dai tre gruppi ed il relativo numero di esami di laboratorio eseguiti in rapporto alle dimensioni dei tre gruppi di scrofette non ha consentito nessuna elaborazione di carattere statistico. Per quanto riguarda il rilevamento di PRRSV non siamo quindi in grado di stabilire quale dei quattro sistemi/matrici sia il più adatto/sensibile nell'evidenziare

l'eventuale presenza del virus. Tuttavia l'andamento della sierologia per PRRS (prevalenza di positivi all'interno del gruppo e valori di s/p) e il rilevamento di una PCR positiva da un solo soggetto del gruppo più giovane - da poco entrato nel reparto accrescimento/condizionamento – ci permette di affermare che il sistema di “acclimatamento per contatto” stava ancora funzionando al momento dei prelievi e consentiva una “adeguata” preparazione delle scrofette prima dell'ingresso in scrofaia senza rilevare scrofette portatrici (carrier) di PRRSV tra gli animali delle due rimonte più vecchie rispettivamente in uscita dalla fase acclimatamento e che erano già in scrofaia fase stimolazione.

CONCLUSIONI

L'eventuale programma di acclimatamento delle scrofette nei confronti di PRRSV – eventualmente accompagnato da programmi vaccinali – deve essere fatto in idonei locali/reparti separati fisicamente e gestionalmente dalla scrofaia. L'intento di tale programma è quello di fornire alle scrofette una adeguata immunità senza che queste rimangano portatrici/eliminatrici di PRRSV al momento dell'introduzione in scrofaia. Il programma di acclimatamento per contatto descritto in precedenza soddisfa tali requisiti. E' tuttavia necessario che ogni azienda sviluppi un proprio programma di controlli mediante adeguate metodiche di prelievo ed esami di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

SCOLLO A., MAZZONI C., TONON F., BORRI E., RAFFI V., DONNA R., GHERPELLI M. (2011) *Atti della Società Italiana Patologia e Allevamento Suini XXXVII Meeting Annuale*, Piacenza 94-101

GUARINO H. *et al.*; (1999) Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription polymerase chain reaction using different regions of the viral genome. *J Vet Diagn Invest* .**11**: 27-33.

OLEKSIEWICZ M. B. *et al.*; (1998) Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet Microbiol*. **64**: 7-22

REVILLA-FERNANDEZ S. *et al.*; (2005) The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. *J Virol Methods*. **126**: 21-30.

FOUCHIER R.A. *et al.*; (2000) Detection of Influenza A Viruses from different species by PCR
Amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol*. **38**: 4096-4101

CARON F. *et al.*, (2000) “Diagnosis and Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infection in pigs by PCR amplification of p36 and p46 genes”. *J Clin Microb*. Vol **38**, pag.1390-1396.

CALSAMIGLIA M. *et al.*, (1999) “Application of nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs”, *J Vet Diagn Invest* , vol. **11**, pag 246-251.