

UN NUOVO APPROCCIO ALLA VALUTAZIONE DEL CONDIZIONAMENTO DELLE SCROFETTE PER IL CONTROLLO DELLA PRRS

A NEW APPROACH TO THE EVALUATION OF GILT ACCLIMATION FOR THE CONTROL OF PRRS

AMADORI M.¹, DRIGO M.², GIACOMINI E.³, LAZZARO M.³, PASOTTO D.²,
BILATO D.¹, RUGGERI J.³, BONIOTTI M.B.⁴, FERLAZZO G.¹, ALBORALI G.L.³

¹Laboratorio di Immunologia Cellulare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della
Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia;

²Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) – Università degli Studi
di Padova, viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italia;

³Sezione Diagnostica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia
Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia;

⁴Laboratorio di Genomica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e
dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia.

Parole chiave: PRRS, scrofette, condizionamento.

Key words: PRRS, gilts, acclimation.

Riassunto: La Sindrome Riproduttiva Respiratoria del suino (PRRS) è un modello complesso d'interazione virus/ospite. La protezione clinica del suino si basa essenzialmente (A) sulla ridotta recettività dei macrofagi al virus, (B) sul controllo della risposta infiammatoria indotta dal virus in associazione ad altri stressori ambientali, infettivi e non-infettivi. Il condizionamento efficace delle scrofette deve pertanto favorire tali azioni di controllo. Abbiamo paragonato le risposte immunitarie delle scrofette in condizionamento in 4 allevamenti stabili e 2 instabili per PRRS. Le scrofette siero-negative per virus PRRS (PRRSV) si infettavano regolarmente in tutti gli allevamenti oggetto di studio. Quattro aspetti vanno sottolineati: 1) La precocità della risposta anticorpale nei fluidi orali di gruppo era del tutto simile a quella determinata sul siero di sangue; 2) la circolazione di PRRSV era presente in tutti i gruppi d'età solo negli allevamenti instabili; 3) una risposta anticorpale precoce, bilanciata in IgG e IgA nei liquidi orali, era presente solo negli allevamenti stabili; 4) una risposta precoce in IFN-gamma a PRRSV si evidenziava solo negli allevamenti stabili. La viremia da PRRSV aveva un chiaro effetto inibente la risposta IFN-gamma. Negli allevamenti instabili si notava invece una diffusa risposta IFN-gamma nei suinetti sotto scrofa, di chiara origine materna. Vi era anche correlazione tra risposta IgA nei liquidi orali e cessazione dell'escrezione di PRRSV.

Abstract: The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is a complex model of host/virus relationship. Clinical protection of pigs is based: (A) on reduced susceptibility of macrophages to PRRSV infection and replication; (B) on the control over the inflammatory response caused by PRRSV and other environmental, infectious and non-infectious stressors. Therefore, successful acclimation of gilts should be conducive to such control actions. In order to establish correct parameters of evaluation, we compared the dynamics of the immune responses of gilts in four PRRS-stable and two unstable farms. PRRS-free gilts got regularly infected after entering PRRS-stable and unstable farms. Four main results should be highlighted: A) the precocity of the antibody response in oral fluids was generally similar to that recorded in sera; B) circulation of PRRSV was consistently detected in all age groups in unstable herds, only;

C) an early, balanced, IgA and IgG response in oral fluids was only observed in PRRS-stable herds; D) an early IFN-gamma response after PRRSV infection was detected in PRRS-stable herds, only. This response was also observed in suckling piglets of unstable herds, likely due to transfer of maternal immunity. Furthermore, the mucosal IgA response was associated with cessation of virus excretion in oral fluid samples.

INTRODUZIONE

La sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) è ancora una delle principali cause di perdite dirette e indirette negli allevamenti di suini in tutto il mondo. L'agente eziologico (PRRS Virus, PRRSV) è un virus RNA a catena positiva della famiglia *Arteriviridae*. Mentre l'infezione da PRRSV è presente nella grande maggioranza degli allevamenti di suini, la frequenza dei casi di malattia è molto variabile. Due tipi di arterivirus suino sono stati identificati fino ad oggi come agenti eziologici: il genotipo tipo-1, europeo (UE), con il primo ceppo isolato nel 1991 e denominato "Lelystad"; il genotipo tipo-2 nordamericano (NA), isolato nel 1992 con l'acronimo ATCC VR-2332 (Nelsen et al., 1999). Numerosi segni di malattia possono essere rilevati in azienda secondo l'età del maiale e la fase di produzione: piressia, problemi respiratori, crescita lenta, diminuzione dell'alimentazione, letargia, anoressia, febbre, tosse e dispnea in tutte le età (sindrome infettiva generale); polmonite, congiuntivite, infezione batterica secondaria in suini svezzati e magroni; sindrome "Orecchio Blu", problemi riproduttivi, aborti epidemici, mortalità nelle scrofe; infertilità nei verri (Zimmerman et al., 2006).

L'infezione sperimentale delle scrofe con PRRSV in tarda gestazione riproduce costantemente la malattia, mentre in altri casi la PRRS è un modello elusivo di relazione virus/ospite, in cui la malattia conclamata è il possibile risultato finale di una complessa interazione tra ospite, virus e condizioni ambientali. Nonostante ampi studi, sorveglianza diffusa e attività di controllo nelle aziende suinicole, la PRRS rappresenta ancora una grave minaccia per la filiera suinicola, alla base di elevate perdite dirette e indirette (Holtkamp D.J. 2013).

Diversi motivi spiegano le condizioni presenti. Fondamentalmente, le misure di controllo della malattia potrebbero avere fondamenti teorici non adeguati, dal momento che i problemi critici della patogenicità del PRRSV e dell'interazione virus/ospite negli animali vaccinati e non immunizzati sono ancora mal definiti. In questo scenario, il controllo della PRRS nelle aziende infette è generalmente perseguito con procedure consolidate basate su una combinazione di misure di gestione aziendale e di biosicurezza. Queste possono essere integrate dall'uso di vaccini vivi attenuati o inattivati, nonché da programmi di acclimatemento volti ad un'esposizione controllata delle scrofette ai ceppi PRRSV circolanti in azienda prima del periodo riproduttivo.

Nel complesso, i programmi di controllo della malattia mirano alla "stabilizzazione" dell'azienda come priorità, ovvero a una condizione in cui i segni clinici della PRRS siano assenti nella popolazione dell'allevamento e PRRSV non sia più trasmesso dalle scrofe alla loro progenie (Holtkamp et al., 2011). A questo proposito, i parametri riconosciuti predittivi di protezione clinica sono in realtà carenti. In generale, vi è spesso evidenza di una scarsa risposta del sistema immunitario innato all'infezione da PRRSV, nonché di un ritardo abnorme nell'insorgenza di risposte in anticorpi neutralizzanti e interferone (IFN)-gamma (Mateu and Diaz, 2008), il che sarebbe correlato alla prolungata persistenza dei virus nell'ospite. Tuttavia, è ben noto che la cessazione della viremia da PRRSV avviene spesso prima dell'insorgenza di tali aspetti di immunità adattativa (Mateu and Diaz, 2008). Ciò fa dubitare di un ruolo importante dell'immunità adattativa dopo infezione da PRRSV.

Ci siamo pertanto chiesti quali parametri immunitari fossero correlati ad un efficace condizionamento delle scrofette introdotte in un allevamento infetto da PRRSV. Abbiamo pertanto deciso di verificare in forma comparativa il decorso temporale di fondamentali

parametri immunitari in scrofette introdotte, rispettivamente, in allevamenti stabili ed instabili per PRRS, al fine di enucleare marcatori associati ad un efficace controllo della malattia in campo.

MATERIALI E METODI

Azienda stabile (S)1. La prima parte del nostro studio è stata condotta in un'azienda suinicola a ciclo aperto con genetica PIC® - Camborough® delle scrofe, localizzata in Veneto, il cui obiettivo commerciale è vendere suinetti di peso compreso tra 30 e 35 kg, nati da 350-400 scrofe. L'allevamento introduce scrofette sieronegative per PRRSV di 4 settimane di vita ogni due mesi. Queste sono alloggiare in capannine interne per 6-7 settimane senza alcuna deliberata esposizione a PRRSV. Otto scrofette di tre successivi gruppi di rimonta sono state controllate ai seguenti tempi dopo l'arrivo: T1 = giorno 1; T2 = giorno 49 (uscita dalle capannine); T3 = giorno 63; T4 = giorno 77; T5 = giorno 91; T6 = giorno 105.

Azienda S2. Si tratta di un'azienda a ciclo aperto in Lombardia, in cui circa l'80% dei suini viene venduto a 30 kg di peso, mentre la restante parte (20%) viene allevata fino a raggiungere il peso di mercato normale (160 kg di peso) in unità di ingrasso. L'azienda ha un livello intermedio di biosicurezza, ovvero l'accesso non è strettamente regolamentato. A distanza di 20 metri circa dalle unità di magronaggio/finissaggio, scrofette sieronegative per PRRSV di 4 mesi di vita sono introdotte in un box di quarantena, dove restano per 60 giorni circa.

Azienda S3. Si tratta di un'azienda a ciclo aperto in Lombardia in cui tutti i suini sono portati a circa 30 kg di peso. L'azienda ha un livello intermedio di biosicurezza con controllo parziale degli accessi. Scrofette di rimonta di 5 mesi di vita sono introdotte ogni due mesi nell'unità gestazione senza un sistema tutto pieno/tutto vuoto. Qui le scrofette rimangono fino a circa 120 kg di peso.

Azienda S4. Questo è un sito 1 di un sistema di produzione suinicola multi-sito, in cui suinetti svezzati a 25 giorni vengono spostati nel sito 2. L'azienda ha un alto livello di biosicurezza e comprende circa 2.900 scrofe da riproduzione. La struttura di quarantena si trova a circa 1,5 km dal nucleo di riproduzione. La quarantena viene gestita come un'azienda indipendente (ingresso controllato e personale dedicato). Scrofette di rimonta sieronegative per PRRSV di 28 giorni di vita arrivano ogni due mesi e rimangono nell'unità di quarantena per tre mesi.

Nelle aziende S2/3/4 sono stati controllati da uno a quattro gruppi di scrofette da 15 soggetti l'uno ad intervalli di 15 giorni per 2-3 mesi dal momento del loro arrivo.

Azienda instabile (I)1. Azienda a ciclo aperto di genetica Goland con circa 600 scrofe che vende suinetti di circa 30 kg di peso. In presenza di buon contenimento esterno, il problema fondamentale è l'assenza di un flusso unidirezionale degli animali. Scrofette di rimonta sieronegative per PRRSV di 4 settimane di vita sono direttamente introdotte in azienda, in capannoni con animali della stessa età. Non esiste uno specifico programma di condizionamento. La presenza di diffusa malattia clinicamente conclamata al momento dello studio ci ha costretto ad eseguire uno studio cross-sezionale su diversi gruppi di animali nello stesso giorno, con età pari a 28, 42, 56 e 70 giorni di vita. Sono stati inclusi nel campionamento otto animali per gruppo.

Azienda I2. E' stata inclusa nello studio una seconda azienda instabile a ciclo chiuso con circa 1000 scrofe danesi, situata in regione Lombardia. E' un'azienda con basso livello di biosicurezza: è confinante infatti con un'azienda da ingrasso che presenta ampia circolazione di PRRSV, i cui veicoli transitano nel territorio dell'azienda I2. Non c'è quarantena: scrofette di 70 kg di peso vivo sieronegative per PRRSV sono direttamente introdotte ogni due mesi nell'unità gestazione, alloggiare in box adiacenti a quelli delle scrofe adulte. Un gruppo di 15

scrofette di rimonta è stato controllato per 6 volte ad intervalli di 15 giorni a partire dal giorno dell'arrivo in azienda.

Campioni prelevati. Da ciascun soggetto era prelevato sangue venoso in provette con e senza litio eparina per saggi, rispettivamente, di immunità cellulare e di risposta anticorpale. Liquidi orali di gruppo erano prelevati mediante cordino ad estremità sfrangiata, con esposizione variante da 1 ora (suini di 4 settimane di vita) a 20 minuti (suini di 3 mesi e più di vita).

Saggi di laboratorio. La viremia da PRRSV e la sua presenza nei liquidi orali veniva valutata mediante real time RT-PCR per il gene ORF 7, come descritto in precedenza (Drigo et al. 2014) nelle aziende S1 e I1 (limite di sensibilità per tipo PRRSV EU: 125 copie/ μ L). Nelle altre aziende si è impiegato invece un kit commerciale real time RT-PCR (NucleoMag® Vet kit, Macherey-Nagel, Düren, Germany) secondo le istruzioni del produttore (limite di sensibilità per tipo PRRSV EU: 0.642 copie genomiche/ μ L).

I titoli anticorpali sierici (espressi come indice s/p) sono stati determinati mediante kit ELISA commerciale (Herdcheck PRRS X3 Antibody Test Kit, IDEXX), secondo le istruzioni del produttore. Lo stesso kit è stato adattato ai fluidi orali introducendo nella procedura, rispettivamente, antisieri anti-IgG e IgA suine coniugati con perossidasi, e diluendo opportunamente i controlli positivi e negativi dei kit per raggiungere i consueti valori di Densità Ottica (DO) soglia. Inoltre, a differenza dei campioni di siero, i fluidi orali diluiti 1:2 sono stati fatti reagire durante la notte a 4° C con le strisce rivestite di Ag. Questa procedura era stata convalidata su fluidi orali di suini raccolti prima e dopo un'infezione intranasale sperimentale con un ceppo PRRSV EU (Amadori M., risultati non pubblicati). Sulla base dei nostri dati sperimentali, un rapporto s/p di 0,4 è stato identificato come soglia per i campioni IgG e IgA-positivi. I campioni con s/p <0,4 sono stati considerati negativi. I valori s/p specifici per IgG e IgA di ciascun campione sono stati confrontati. La risposta Ab è stata considerata sbilanciata se il valore s/p specifico per IgA era \leq 50% di quello specifico per IgG.

La risposta cellulo-mediata dei suini a PRRSV venne valutata mediante saggio di rilascio di IFN-gamma PRRSV-specifico in campioni di sangue intero eparinato, come descritto in precedenza (Dotti et al. 2011).

Analisi statistica

La possibile associazione tra viremia PRRSV e risposta IFN-gamma è stata valutata mediante test esatto di Fisher (Graph Pad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). La soglia di significatività statistica era posta a $P < 0,05$.

RISULTATI

Allevamenti stabili. Nell'azienda S1, i tre gruppi di scrofette si sono infettati con PRRSV da sette (gruppo 1) a nove settimane (gruppi 2 e 3) dopo l'ingresso. Non sono state riscontrate discrepanze tra anticorpi sierici e mucosali nel rivelare l'infezione da PRRSV. Alcune scrofette del gruppo 1 sono risultate positive al test di rilascio dell'IFN-gamma dopo la sierconversione e sono risultate negative al T6. Al contrario, alcune scrofette infettatesi più tardivamente (gruppi 2 e 3) erano ancora positive al T6. Tutti i campioni di siero e liquido orale sono risultati negativi in real time RT-PCR. Nelle altre aziende stabili PRRS (S2 - S4), i risultati sono stati in accordo con quelli dell'allevamento S1, anche se con segni distinti di circolazione del virus (vedi figura 1, che si riferisce all'azienda S3). Tutte le scrofette studiate sono rimaste in buone condizioni di salute durante il periodo di osservazione e si sono infettate in momenti diversi dopo l'arrivo, come rivelato sia dal saggio PCR che dai test anticorpali. C'era una chiara associazione negativa ($P < 0,01$) tra viremia PRRSV e risposta IFN-gamma, mentre né anticorpi sierici né risposte IFN-gamma erano associati alla cessazione della viremia. Analogamente a

quanto registrato nell'azienda S1, c'erano evidenti discrepanze nello sviluppo delle risposte IgA e IgG specifiche per PRRSV nei fluidi orali. L'escrezione di virus nei fluidi orali era generalmente associata a bassi rapporti s/p IgA/IgG (prevalenti risposte IgG). Ancora una volta, le analisi degli anticorpi mucosali e sierici non differivano in termini di precocità diagnostica negli allevamenti S3 e S4, mentre il siero forniva una più precoce indicazione (T2 contro T3) nell'azienda S2.

Allevamenti instabili

Nell'azienda instabile I1, era in corso un'ondata di aborti, elevata mortalità nei suinetti lattanti (circa il 20% di mortalità), una sindrome respiratoria nei suinetti svezzati, ridotta fertilità (tasso di portata al parto 80%) nel periodo del nostro studio. In accordo con i risultati clinici, i suini erano infetti da PRRSV dal periodo sotto scrofa in poi, come dimostrato dai saggi sierologici e molecolari. Tutti i maiali tranne quelli di 70 giorni di vita erano sia viremici che escretori tramite i liquidi orali. Con l'eccezione di un solo suino, l'immunità cellulo-mediata non è stata evidenziata dopo il primo campionamento (a 28 giorni di età). La risposta anticorpale nei campioni di liquido orale era peculiare. Dopo l'infezione nel periodo di allattamento, la risposta Ab è stata sostanzialmente sbilanciata verso l'isotipo IgG (derivante da trasudato sierico) per 10 settimane circa. Solo nei suini di 70 giorni era possibile rilevare una risposta equilibrata in IgA e IgG in campioni di liquido orale, associata all'assenza di escrezione di PRRSV.

Nell'azienda instabile I2, circa il 15% dei suinetti svezzati presentava cianosi cutanea nelle regioni della coscia e dell'orecchio, oltre a ottundimento del sensorio e febbre. La mortalità si è attestata a questo stadio al 10%. Per quanto riguarda il comparto riproduzione, durante il nostro studio sono stati osservati un tasso di aborto del 15% nell'ultimo terzo della gravidanza e un aumento di nidiate con malattia. Inoltre, la mortalità nelle scrofe è salita al 4%. C'è stata una sieroconversione precoce di scrofette al T2 e persistenza di elevati titoli di anticorpi fino a T6. La viremia persisteva a titoli alti tra T2 e T5. Non si è verificata alcuna escrezione di virus in liquidi orali a T2, al contrario di T3 e T4, il che ancora una volta ha coinciso con l'aumento di IgG e con la riduzione di IgA nei liquidi orali. La risposta IFN-gamma era soppressa in presenza di viremia a T2, T3 e T4 ed è parzialmente ripresa in suini non viremici a T5 e T6 ($P < 0,001$).

DISCUSSIONE

Le indagini in campo condotte in allevamenti stabili e instabili per PRRS hanno evidenziato differenze fondamentali tra i due tipi di allevamenti in termini di caratteristiche cliniche, stato virologico e risposta immunitaria adattativa all'infezione da PRRSV.

In primo luogo, la risposta IFN-gamma a PRRSV oltre il periodo sotto scrofa o non è stata osservata o era ritardata in modo abnorme nelle due aziende instabili oggetto di studio. L'alta prevalenza di campioni positivi al test nel gruppo di suini di 28 giorni nell'azienda I1 era probabilmente dovuta al trasferimento materno di linfociti T specifici per PRRSV, in accordo con i modelli consolidati di trasferimento materno dell'immunità cellulo-mediata nei suini (Bandrick et al. 2014). In particolare, si è dimostrata un'associazione negativa tra viremia PRRSV e risposta IFN-gamma dei suini, in accordo con le ben note proprietà immunosoppressive di PRRSV (Thanawongnuwech et al., 2000; Xiao et al., 2004).

L'infezione da PRRSV era rilevata con efficienza e precocità simili con test anticorpali su siero e su campioni di liquido orale. Paragonando i risultati nei due saggi, 1-2 suini su 8 potrebbero essere sufficienti per rilevare l'infezione nel cordino di gruppo. La cosa più importante è che le risposte anticorpali specifiche per isotipo nei campioni di liquido orale sono risultate diverse tra allevamenti stabili e instabili. In particolare, un profilo equilibrato di risposta anticorpale dopo l'infezione (rapporto IgA/IgG intorno a 1) era osservato precocemente nell'azienda S1, ovvero proprio all'inizio dello studio (gruppo di scrofette 2), dopo 40 giorni (gruppo 1) e 30 giorni (gruppo 3), circa.

La risposta IgA era simile nell'azienda S4 e meno pronunciata invece nelle aziende S2 e S3. Invece, dopo l'infezione nel periodo sotto scrofa in azienda I1, un rapporto IgA/IgG bilanciato è stato osservato solo nei suini di 70 giorni, il che coincideva con la mancata escrezione di PRRSV nei campioni di liquido orale e, presumibilmente, con un minore ricircolo di virus nel gruppo. Inoltre, nelle aziende S2 e S3 (gruppo di scrofette 2), l'escrezione del virus è stata sempre registrata in presenza di bassi rapporti IgA/IgG.

L'escrezione di PRRSV in campioni di liquido orale non era sempre correlata alla viremia, il che indica un ruolo importante dei tessuti linfoidi della cavità orale come nicchia di macrofagi che ospitano a lungo il virus (O'Sullivan et al., 2011). Ciò conduce ad una sostanziale rivalutazione dei campioni di liquido orale per il monitoraggio del condizionamento delle scrofette di rimonta. Tale monitoraggio è tuttora basato sulla verifica della viremia PRRSV come indicatore di un contatto efficace con il virus di campo. Sulla base dei nostri risultati, possiamo affermare che si tratta di un approccio non esaustivo al problema per due ordini di motivi:

1. Un efficace condizionamento delle scrofette può decorrere anche in assenza di viremia. Le caratteristiche di virulenza dei ceppi virali e/o la permissività d'ospite sono alla base del diverso decorso dell'infezione virale.
2. L'enfasi eccessiva sulla viremia può distogliere l'attenzione da due parametri fondamentali di valutazione: (a) la sensibilizzazione dell'immunità cellulare e (b) l'attivazione della risposta immuno-secretoaria IgA nei liquidi orali. Quest'ultimo aspetto manifesta un'evidente correlazione con il blocco della disseminazione virale tramite i liquidi orali. Bisognerà stabilire in futuro se si tratta di un effetto antivirale diretto o mediato da una modulazione negativa della recettività dei macrofagi al PRRSV. Al di là di tale aspetto, prove *in vitro* su macrofagi alveolari suini hanno dimostrato che le IgA secrete purificate anti-PRRSV hanno cospicua attività antivirale a differenza delle IgG, che addirittura possono amplificare l'infezione virale (Ruggeri, Ferlazzo, 2017, dati non pubblicati).

Una nota di cautela deve essere espressa riguardo alle differenze d'età delle scrofette avviate alla rimonta aziendale. I nostri risultati indicano che i parametri immunitari favorevoli di cui sopra (risposte IgA e IFN-gamma) hanno bisogno di tempo per instaurarsi stabilmente durante il condizionamento. In questo senso, la dinamica di sviluppo di tali parametri potrebbe essere sostanzialmente diversa tra scrofette di età diversa, come anche suggerito dai nostri risultati. Inoltre, cicli di condizionamento tardivi potrebbero comportare in situazioni aziendali "problema" rischi sanitari sostanziali dopo l'avvio delle scrofette alla fase riproduttiva. Alla base di tali rischi vi sarebbe per l'appunto un incompleto dispiegamento dei processi di maturazione della risposta immunitaria.

In accordo con i dati da noi forniti in passato (Amadori, Razzuoli, 2014), tale maturazione porterebbe ad uno stato di ridotta/nulla recettività dei macrofagi all'infezione virale, accompagnato da un controllo sostanziale della risposta infiammatoria indotta da PRRSV in associazione a batteri, endotossina batterica ambientale, stressori ambientali fisico-chimici e psicotici. Il ruolo della risposta immunitaria adattativa dopo infezione (anticorpi, linfociti T citotossici) è invece molto più incerto e scarsamente definito.

In sostanza, sulla base dei nostri risultati, è consigliabile operare il condizionamento su scrofette molto giovani, se possibile appena dopo lo svezzamento. A 4 – 6 settimane dall'ingresso in azienda, è opportuno valutare con cordino di gruppo il rapporto quali-quantitativo tra risposta IgG e IgA nei liquidi orali e verificare la presenza di reattori IFN-gamma a PRRSV. Con la stessa

provetta (frazione di plasma) è anche possibile verificare la viremia mediante real time RT-PCR. In presenza di dati positivi, con o senza viremia in atto, il gruppo potrà dirsi ben condizionato. In caso contrario, potrà essere utile ripetere i test a distanza di 4 settimane circa e valutare l'opportunità di un intervento vaccinale sui gruppi a rischio qualora essi non siano viremici. Tale schema di lavoro può comportare una migliore valutazione dell'idoneità delle scrofette all'ingresso in riproduzione e determinare nel complesso un migliore controllo della PRRS nel settore.

CONCLUSIONI

- La risposta anticorpale a PRRSV è altrettanto precoce nei liquidi orali rispetto al siero di sangue.
- I suini manifestano diversi rapporti tra IgA e IgG anti-PRRSV nei liquidi orali.
- La risposta anticorpale IgA nei liquidi orali inibisce la disseminazione virale nell'ambiente tramite i liquidi orali.
- La viremia da PRRSV è associata negativamente alla risposta in IFN-gamma.
- La risposta immunitaria a virus PRRS differisce sostanzialmente tra allevamenti stabili ed instabili per PRRS.

BIBLIOGRAFIA

Amadori M., Razzuoli, E. (2014). "Immune control of PRRS: lessons to be learned and possible ways forward". *Front. Vet. Sci.* 1, article 2. doi: 10.3389/fvets.2014.00002.

Bandrick M., Ariza-Nieto, C., Baidoo, S.K., Molitor, T.W. (2014). "Colostrum antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets". *Dev. Comp. Immunol.* 43, 114-120.

Dotti S., Villa, R., Sossi, E., Guadagnini, G., Salvini, F., Ferrari, M., Amadori, M. (2011). "Comparative evaluation of PRRS virus infection in vaccinated and naive pigs". *Res. Vet. Sci.* 90, 218-225.

Drigo M., Franzo, G., Belfanti, I., Martini, M., Mondin, A., Ceglie, L. (2014). "Validation and comparison of different end point and real time RT-PCR assays for detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus". *J. Virol. Methods* 201, 79-85.

Holtkamp D.J. (2013). "Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers". *Journal of Swine Health and Production* 21, 72-84.

Holtkamp D.J., Polson, D.D., Torremorell, M., Morrison, B., Classen, D.M., Becton, L., Henry, S., Rodibaugh, M.T., Rowland, R.R., Snelson, H., Straw, B., Yeske, P., Zimmerman, J. (2011). "Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status". *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere* 39, 101-112.

Mateu E., Diaz, I. (2008). "The challenge of PRRS immunology". *Vet. J.* 177, 345-351.

Nelsen C.J., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S. (1999). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents". *J. Virol.* 73, 270-280.

O'Sullivan T., Friendship, R., Blackwell, T., Pearl, D., McEwen, B., Carman, S., Slavic, D., Dewey, C. (2011). "Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter". *Can. J. Vet. Res.* 75, 106-111.

Thanawongnuwech R., Brown, G.B., Halbur, P.G., Roth, J.A., Royer, R.L., Thacker, B.J. (2000). "Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection". *Vet. Pathol.* 37, 143-152.

Xiao Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P. (2004). "The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load". *J. Virol.* 78, 5923-5933.

Zimmerman J., Benfield, D.A., Murtaugh, M.P., Osorio, F., Stevenson, G.W., Tottemorell, M. (2006). "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (porcine Arterivirus)" in: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. "Diseases of Swine", 9th edition. Blackwell Publishing Professional, Ames, 387-417.

ALLEVAMENTO S3

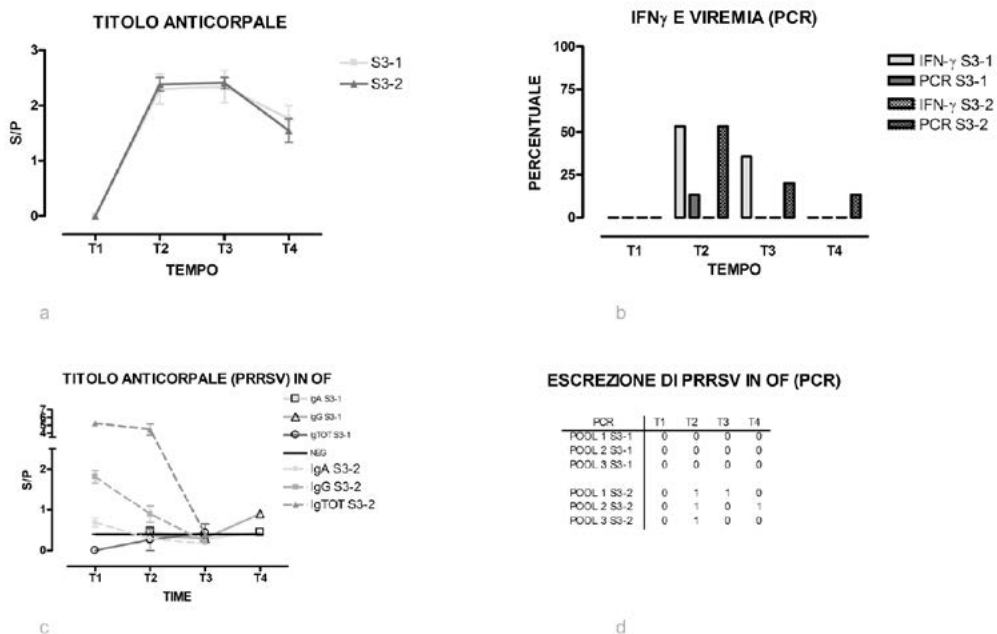


Figura 1: Risultati di laboratorio ottenuti nell'azienda S3. Siero, sangue intero eparinato e campioni di fluidi orali sono stati raccolti da due gruppi di 15 scrofette ciascuno (S3-1 e S3-2). I quattro pannelli raffigurano, rispettivamente, la risposta anticorpale sierica a PRRSV (in alto a sinistra), le risposte anticorpali IgG e IgA nei fluidi orali (in basso a sinistra), viremia PRRSV e risposta IFN-gamma (in alto a destra), escrezione di PRRSV in fluidi orali (in basso a destra), rispettivamente. L'escrezione di PRRSV nei fluidi orali è mostrata in termini di pool positivo (simbolo 1) e negativo (simbolo 0) in PCR, di 5 campioni ciascuno in entrambi i gruppi di scrofette. La prevalenza di positivi al saggio IFN-gamma in soggetti PRRSV-viremici e non-viremici risultava essere significativamente diversa secondo il test esatto di Fisher ($P < 0,001$).

Tabella 1: Allevamento stabile per PRRS S1: risultati di laboratorio

GRUPPO 1	T1 (giorno 1)	T2 (giorno 49)	T3 (giorno 63)	T4 (giorno 77)	T5 (giorno 91)	T6 (giorno 105)
Ab siero: media s/p	0	0,35	ND	0,92	0,76	0,86
Ab siero: positivi/totale	0/8	3/8	ND	8/8	7/8	8/8
Fluidi orali: media s/p IgA	0 (neg)	0,61 (pos)	ND	0,49 (pos)	0,87 (pos)	0,75 (pos)
Fluidi orali: media s/p IgG	0,10 (neg)	1,83 (pos)	ND	1,04 (pos)	1,16 (pos)	1,06 (pos)
Saggio IFN-g positivi/totale	ND	4/8	ND	ND	ND	0/8

GRUPPO 2	T1 (giorno 1)	T2 (giorno 49)	T3 (giorno 63)	T4 (giorno 77)	T5 (giorno 91)	T6 (giorno 105)
Ab siero: media s/p	0,01	0,08	0,93	1,11	1,03	ND
Ab siero: positivi/totale	0/8	1/8	8/8	8/8	8/8	ND
Fluidi orali: media s/p IgA	0,02 (neg)	0,21 (neg)	0,91 (pos)	0,53 (pos)	0,49 (pos)	ND
Fluidi orali: media s/p IgG	0,12 (neg)	0,23 (neg)	0,84 (pos)	1,09 (pos)	0,86 (pos)	ND
Saggio IFN-g positivi/totale	ND	0/8	ND	ND	ND	4/8

GRUPPO 3	T1 (giorno 1)	T2 (giorno 49)	T3 (giorno 63)	T4 (giorno 77)	T5 (giorno 91)	T6 (giorno 105)
Ab siero: media s/p	0	0,05	0,11	0,89	0,65	0,75
Ab siero: positivi/totale	0/8	0/8	1/7	7/7	7/7	6/7
Fluidi orali: media s/p IgA	0 (neg)	0 (neg)	0.17 (neg)	0.07 (neg)	0.27 (neg)	0.8 (pos)
Fluidi orali: media s/p IgG	0,04 (neg)	0,03 (neg)	0,28 (neg)	0,5 (pos)	1,0 (pos)	0,77 (pos)
Saggio IFN-g positivi/totale	ND	0/8	ND	ND	ND	2/7

Tre gruppi di scrofette sono stati introdotti nel settore della quarantena. Sono stati ispezionati clinicamente e sono stati effettuati prelievi ai tempi indicati. Pos: campione positivo. Neg: campione negativo. ND: non eseguito. La RT-PCR Real-time per il gene PRRSV ORF7 era sempre negativa sui campioni di siero e liquido orale (dati non mostrati).

Tabella 2: Allevamento instabile per PRRS II: risultati di laboratorio

	Suini di 28 giorni di vita	Suini di 42 giorni di vita	Suini di 56 giorni di vita	Suini di 70 giorni di vita
Ab siero: media s/p	1,19	0,77	1,72	1,45
Ab siero: positivi/totale	8/8	5/8	8/8	7/8
Fluidi orali: media s/p IgA	2,38 (pos)	0,29 (neg)	0,78 (pos)	0,49 (pos)
Fluidi orali: media s/p IgG	3,53 (pos)	1,98 (pos)	2,43	0,75 (pos)
Saggio IFN-g: positivi/totale	6/8	0/8	1/8	0/8
RT-PCR real time siero	pos	pos	pos	pos
RT-PCR real time fluidi orali	pos	pos	pos	neg

Uno studio trasversale è stato condotto in un allevamento instabile per PRRS in presenza sia di malattia respiratoria che riproduttiva. Due pool di 4 campioni di siero ciascuno sono stati analizzati mediante RT-PCR real-time per il gene PRRSV ORF7. Pos: campione positivo. Neg: campione negativo.