

DINAMICA TEMPORALE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA VERSO IL VIRUS DELLA PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS) IN SCROFETTE

KINETIC DEVELOPMENT OF IMMUNE RESPONSE TO PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS) IN GILTS

DOTTI S.¹, SANDRI G.P.², VILLA R.¹, RAZZUOLI E.¹, SOSSI E.¹, AMADORI M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede di Brescia;

²Soc. Agricola Tre Valli, Gruppo Veronesi

Parole chiave: IgA, PRRS, IFN- γ

Key words: IgA, PRRS, IFN- γ

RIASSUNTO. Scopo del lavoro è stato valutare la cinetica di sviluppo della risposta immunitaria a virus PRRS in due situazioni aziendali differenti. Gli animali arrivavano da due scrofaie identificate come SG e M; entrambe erano PRRS positive, con rimonta proveniente da un moltiplicatore PRRS-free. La problematica da affrontare in tali strutture è stata l'introduzione di un considerevole numero di animali PRRS negativi in un allevamento positivo, al fine di non generare instabilità all'interno delle aziende. A tale scopo si sono messe in opera due diverse "procedure di acclimatamento" per PRRSV: vaccinazione in allevamento SG, condizionamento in allevamento M tramite contatto diretto con soggetti escretori. La risposta cellulosa-mediata è stata valutata con l'analisi della presenza di interferone- γ nel plasma dei suini in risposta a PRRSV; i risultati hanno evidenziato, in entrambi i casi, una scarsa induzione di questa citochina a dispetto della siero-conversione anticorpale. Questo risultato confermerebbe quanto riportato anche da altri autori e cioè che non vi è una corrispondenza tra i due tipi di immunità sia con una stimolazione di tipo vaccinale sia con un contatto diretto di animali viremici. Inoltre, i campioni di saliva, prelevati nell'allevamento M, hanno consentito la messa a punto di una metodica ELISA atta ad individuare IgA PRRSV-specifiche, la cui valutazione potrebbe essere affiancata alle altre metodiche normalmente impiegate per la diagnosi della malattia.

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the time-course of the immune response to PRRS virus in two PRRSV-positive farms, hereunder named SG and M. Gilts originating from a PRRS-negative multiplier had to be introduced into two PRRS positive commercial herd and the purpose was to house them without creating PRRS outbreaks in the receiving farms under study. For this purpose, two different strategies were adopted: vaccination in farm SG and direct contact with viremic animals in farm M. The cell-mediated immune response was evaluated by a PRRSV-specific interferon- γ release assay; the results showed, in both farms, that the cell-mediated response occurred at a low level and frequency, as opposed to the Ab response. This finding confirms the results by other authors, i.e. the discrepancy between the two kinds of immune response to PRRSV (humoral and cell-mediated), following both vaccination and direct contact with viremic animals. Moreover, with saliva samples collected in farm M, an ELISA assay was performed to detect PRRSV-specific IgA antibodies, the assessment of which could be useful in association with other routine diagnostic methods.

INTRODUZIONE

Il virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRSV) è un *Arterivirus* ad RNA, il quale negli ultimi vent'anni è diventato uno dei maggiori patogeni negli allevamenti suinicoli di tutto il mondo. A tutt'oggi sono stati riconosciuti due genotipi: tipo I (ceppo Europeo) e tipo II (ceppo Americano); inoltre, all'interno di questi due gruppi, esistono numerose varianti che differiscono anche solo per poche basi fra di loro. Tali variazioni geniche possono consentire al virus di sfuggire al sistema immunitario, impedendo a quest'ultimo di innescare una risposta efficace atta ad arrestare lo sviluppo della sintomatologia. I numerosi studi riguardanti la risposta immunitaria di tipo anticorpale (IgM e IgG), hanno dimostrato che il virus determina la comparsa delle immunoglobuline sieriche tra i 7 ed i 14 giorni post infezione, anche se le stesse non presentano un'attività protettiva nei confronti del virus (1). Invece, il ruolo dell'immunità cellulo-mediata non è ancora stato chiarito, anche se si è evidenziato come PRRSV sia in grado di interferire con la secrezione di interferone- γ (IFN- γ) e di interleuchina 10 (IL-10), compromettendo la corretta attivazione dei circuiti citochinici (5, 6). Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la risposta immunitaria di soggetti sottoposti a vaccinazione con virus vivo modificato ed inoculato per via intramuscolare e soggetti sottoposti ad un contatto con animali escretori ed infettatisi naturalmente. I suini sono stati monitorati mediante prelievi ematici al fine di determinare: viremia, immunità umorale, cellulo-mediata; inoltre, sono stati eseguiti prelievi di saliva mediante tamponi per una valutazione dell'immunità mucosale (IgA). In questo senso, il nostro lavoro rappresenta uno studio preliminare sulla cinetica delle immunoglobuline di tipo secretorio (IgA), la cui valutazione potrebbe essere utile al fine di avere un quadro più completo sia per quanto riguarda il meccanismo di interazione virus-ospite sia per la diagnosi di campo.

MATERIALI E METODI

Animali. I due allevamenti oggetto della prova denominati rispettivamente come azienda SG, M e PRRS positive, ricevevano la rimonta ogni quattro settimane di scrofette svezzate a 6 kg di peso (ca. 3 settimane di vita) da un moltiplicatore PRRS negativo. Gli animali erano alloggiati in appositi reparti di "quarantena/svezzamento" situati all'interno del perimetro aziendale, dove sostavano per 8-9 settimane. Successivamente, i gruppi di scrofette erano spostati nei reparti di accrescimento nei quali rimanevano fino all'età di circa 180 giorni, per essere poi trasferite definitivamente alla scrofaia. Nell'allevamento SG si è deciso di immunizzare le scrofette (12 soggetti) mediante vaccinazione, il primo intervento veniva effettuato con un vaccino vivo modificato (*Porsilis PRRS[®] - Intervet*) due settimane dopo l'arrivo in svezzamento (5 settimane di vita); il secondo intervento di richiamo era somministrato nella fase di accrescimento a circa 5 mesi di vita, utilizzando un vaccino inattivato (*Progressis PRRS[®] Merial*). Nell'allevamento M si è invece deciso di adottare una procedura di acclimatamento per contatto con soggetti eliminatori. Le scrofette (15 animali) arrivate in allevamento nel reparto "quarantena/svezzamento", in seguito erano trasferite nella struttura di accrescimento, isolata e a "flusso semi-continuo", dove venivano messe a contatto con soggetti eliminatori provenienti dall'azienda stessa.

In entrambi gli allevamenti le scrofette sottoposte alle due diverse procedure di acclimatamento erano successivamente trasferite nei rispettivi reparti di stimolazione/fecondazione.

Indagini di laboratorio. Ciascun animale è stato sottoposto a due prelievi di sangue, rispettivamente utilizzando provette con e senza litio-eparina, al fine di utilizzare sia la porzione sierica sia quella plasmatica del sangue in esame. Nell'allevamento SG sono stati eseguiti due campionamenti di sangue (primo prelievo T0: 60 giorni dopo il vaccino vivo modificato; secondo prelievo T1: 60 giorni dopo il vaccino inattivato), mentre nell'allevamento M sono stati effettuati tre prelievi (primo prelievo T0: 3 mesi di vita; secondo prelievo T1: circa 5

mesi di vita, fase di acclimatamento; terzo prelievo T2: 9 mesi di vita), inoltre in quest'ultima azienda è stata prelevata anche un'aliquota di saliva per ciascun animale al T1 e al T2. Il siero è stato sottoposto a RT-Real Time PCR per la ricerca dell'acido nucleico ascrivibile al virus della PRRS (7); la valutazione della presenza di anticorpi specifici per PRRSV (IgG) è stata eseguita mediante metodica di tipo immunoenzimatico (ELISA), seguendo le indicazioni del produttore (*Herdcheck® IDEXX Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Antibody Test Kits*). I sieri sono stati utilizzati anche per la prova di inibizione dell'emoagglutinazione (IH) per il virus dell'influenza, tipo A/SW/H1N1, A/SW/H1N2 e A/SW/H3N2 secondo quanto descritto in Van Reeth *et al.* 2006. Il sangue eparinato è stato sottoposto a controllo per la valutazione della risposta in IFN- γ a PRRSV; tale test ha previsto l'impiego di ceppo Lelystad e di un ceppo appartenente al cluster Italiano, di PBS come controllo negativo e di criolisato MARC-145 al fine di evidenziare un possibile segnale di natura aspecifica. Brevemente, tale metodica prevede il contatto di ciascun campione di sangue con i diversi reagenti sopra riportati per 20 ore ad una temperatura di 37°C e 5% di CO₂. Quindi, si procede alla determinazione di IFN- γ secreto nel plasma in un saggio ELISA che prevede l'impiego di IFN- γ capture mAb P2F6 (*Thermo Scientific, Rockford, IL*), e successivamente di anticorpo biotinilato, anti-swine IFN- γ mAb MP701B (*Thermo Scientific, Rockford, IL*); infine, l'IFN- γ suino è rivelato mediante l'impiego di streptavidina HRP-coniugata e ortho-phenilenediamina. La lettura della piastra si esegue con uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 492 nm. I campioni sono considerati positivi se l'OD corrispondente al sangue intero stimolato con il virus della PRRS è maggiore rispetto a quello non stimolato (PBS) e a quello considerato come stimolo aspecifico (MARC-145), con un valore di riferimento positivo di 20 mOD di differenza (riferimento ottenuto mediante analisi eseguite su suini Specific Pathogen Free). La saliva di ciascun animale è stata ottenuta mediante l'impiego di tamponi (*Salivetten®*), i quali portati in laboratorio, sono stati sottoposti a centrifugazione (1000 g a 5°C per 10 minuti). La reazione immunoenzimatica si basa sull'utilizzo di virus della PRRS (ceppo di Lelystad) che viene purificato mediante l'utilizzo di gradienti di saccarosio, in questo modo si ottiene solo la frazione di interesse senza residui di cellule MARC-145, le quali vengono comunemente impiegate per l'amplificazione del virus. La metodica prevede di analizzare i campioni di saliva sia messi a contatto con l'antigene virale sia da soli, per mettere in luce eventuali segnali di tipo aspecifico. La presenza di IgA PRRSV-specifiche è evidenziata mediante l'aggiunta di coniugato anti-IgA suine HRP e di ortho-phenilenediamina, la lettura si effettua con spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 492 nm. Il risultato è espresso come differenza della media ottenuta dai campioni messi a contatto con l'antigene e la media di quelli analizzati senza il medesimo. Il valore di riferimento è pari a 20 mOD di differenza (riferimento ottenuto mediante analisi eseguite su suini Specific Pathogen Free).

RISULTATI. Gli animali non hanno mostrato alcuna sintomatologia clinica evidente e sono tutti entrati nel ciclo riproduttivo di entrambi gli allevamenti. Al primo prelievo, solo un soggetto dell'allevamento SG ha evidenziato positività in RT-Real Time PCR, lo stesso non ha mostrato anticorpi (IgG) specifici nei confronti di PRRSV; tutti gli altri campioni sono risultati virologicamente negativi, ma con IgG sieriche. Al secondo prelievo vi è stata siero-conversione di tutti i soggetti (Tabella n. 1). L'allevamento M non ha mostrato anticorpi al T0 e nemmeno la presenza di RNA virale, mentre al secondo campionamento tutti gli animali tranne uno hanno mostrato anticorpi specifici, i quali hanno evidenziato un andamento calante al T2 (Tabella n. 2).

La risposta in IFN- γ ha indicato 4 animali positivi al secondo prelievo dell'allevamento SG, mentre nell'allevamento M la positività si è evidenziata in 3 soggetti solo al terzo prelievo. Inoltre, alcuni animali hanno mostrato una risposta aspecifica, che potrebbe essere ascrivibile

ad una concomitante infezione virale in atto al momento del prelievo di sangue. Infatti, il siero di tutti gli animali è stato controllato mediante metodica di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) verso il virus dell'influenza e i soggetti con risposta aspecifica in IFN- γ hanno evidenziato una siero-conversione anticorpale nei confronti di H1N1 e H1N2 per l'allevamento SG e H1N2 per l'allevamento M. La risposta in IgA ha evidenziato valori positivi (>20 mOD) in 10 animali su 13 analizzati dell'allevamento M al T1 e solo 3 su 13 al T2, con un andamento inversamente proporzionale, rispetto a quello degli anticorpi sierici al secondo campionamento.

DISCUSSIONE. I dati emersi da questa prova hanno evidenziato nel gruppo sottoposto a vaccinazione (allevamento SG), una risposta bassa in IFN- γ , mentre alcuni soggetti hanno mostrato valori elevati e considerati aspecifici, il che mette in evidenza la possibile presenza di altri agenti virali (influenza) in grado di interferire con la risposta nei confronti del virus della PRRS. In particolare, la positività anticorpale al sottotipo H1N2 non è spiegata dal profilo vaccinale adottato nelle due aziende e quindi ascrivibile a virus di campo. Per quanto riguarda i campioni con esito negativo, tale risultato sembrerebbe suggerire una bassa stimolazione della immunità cellulo-mediata da parte del vaccino (2). Al contrario, la risposta anticorpale è evidente in tutti i soggetti sottoposti a vaccinazione, con la presenza di sieroconversione al secondo prelievo, anche se questo non è sinonimo di protezione come già evidenziato anche da altri Autori (3, 5).

Per quanto riguarda gli animali sottoposti a contatto diretto con soggetti escretori, anche in questo caso la presenza di IFN- γ è abbastanza atipica, in quanto risultano valori bassi con presenza di alcuni campioni che hanno mostrato livelli aspecifici elevati. Le IgG si sviluppano a partire dal terzo campionamento e con andamento variabile, il che dimostra che gli animali si sono infettati con tempistiche differenti.

La valutazione della presenza di IgA specifiche verso il virus della PRRS nella saliva dei suini sottoposti a condizionamento con animali escretori (allevamento M), ha evidenziato soggetti positivi al primo prelievo (10 animali) e i valori sono diminuiti al secondo campionamento, con la positività di soli 3 animali.

In entrambi i casi, la risposta cellulo-mediata (IFN- γ) è risultata meno coinvolta rispetto a quella umorale (IgG); inoltre, le IgA salivari PRRSV specifiche valutate nell'allevamento M, sembrano avere una cinetica differente rispetto alle IgG sieriche, con una drastica riduzione delle prime al T2. Ad una prima analisi, i cui risultati andranno ulteriormente confermati con altri campionamenti, questo andamento potrebbe derivare da un meccanismo di alterazione nella risposta mucosale da parte del virus della PRRS.

CONCLUSIONI. Al momento attuale, non è possibile dire se delle due strategie di acclimatamento impiegate come profilassi (vaccinazione in allevamento infetto, acclimatamento) sia in grado a medio lungo termine di preservare in modo efficace gli animali da possibili re-infezioni con PRRSV; per questo motivo è importante tenere monitorati gli allevamenti ed ottenere il maggior numero di informazioni possibili dai campionamenti eseguiti, al fine di avere un quadro completo ed aggiornato della situazione nel momento in cui si verifica la presenza del virus in allevamento. Questo studio rappresenta una prova preliminare e di messa a punto di due metodiche ELISA (IFN- γ ed IgA) che potrebbero essere affiancate alle tecniche impiegate nella routine diagnostica per PRRS. Questo sarebbe utile per indagare anche l'immunità cellulo-mediata, che, secondo diversi lavori scientifici, sembra essere quella di maggiore interesse nella risposta a questo virus. Il prossimo passo sarà quello di approfondire la valutazione delle IgA mucosali, al fine di capire se queste possano avere un ruolo effettivamente importante nella diagnosi della malattia sia sul singolo animale sia sul gruppo.

BIBLIOGRAFIA. 1) Charentantanakul W., Platt R., Roth J.A. (2006) “Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production”. *Viral Immun.*; 19, 646-661. 2) Charentantanakul W., Platt R., Johnson W., Roof M., Vaughn E., Roth J.A. (2006) “Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus”. *Vet. Imm. and Immunop.* 109, 99-115. 3) Christopher-Hennings J., Faaberg K.S., Murtaugh M.P., Nelson E.A., Roof M.B., Vaughn E.M., Yoon K.J., Zimmerman J. (2002) “Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) diagnostics: Interpretation and Limitations”. *J. Swine Health Prod.* 10 (5), 213-218. 4) Van Reeth K, Labarque G, Pensaert M. (2006) “Serological profiles after consecutive experimental infections of pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 swine influenza viruses.”. *Viral Immunol.* 19 (3), 373-82. 5) Mateu E., Diaz I. (2008) “The challenge of PRRS immunology”. *Vet J.* 177 (3), 345-51. 6) Molina R.M., Cha S.H., Chittick W., Lawson S., Murtaugh M.P., Nelson E.A., Christopher-Hennings J., Yoon K.J., Evans R., Rowland R.R., Wu W.H., Zimmerman J.J. (2008) “Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection”. *Vet Immunol Immunopathol.* 126 (3-4), 283-92. 7) Revilla F. S. Wallner B, Truschner K, Benzczak A, Brem G, Schmoll F, Mueller M, Steinborn R. (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.

Tabella n. 1 Risultati delle indagini virologiche, sierologiche ed immunologiche allevamento SG, utilizzo del vaccino vivo modificato

Table 1: Virological, serological and immunological results, farm SG, modified live vaccine

Allevamento SG (vaccino vivo modificato)						
Prova eseguita	RT-Real Time PCR		ELISA IgG (s/p > 0.4)		ELISA IFN- γ (> 20 mOD)	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1
Campionamento						
Suino 1	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos
Suino 2	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Dub
Suino 3	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos
Suino 4	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Dub
Suino 5	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Dub
Suino 6	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Asp
Suino 7	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg
Suino 8	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Asp
Suino 9	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos
Suino 10	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos
Suino 11	Neg	NE	Pos	NE	Neg	NE
Suino 12	Neg	NE	Pos	NE	Neg	NE

Legenda: NE: non eseguito; Neg: valore negativo; Pos: campione positivo; Dub: campione dubbio; Asp: risposta aspecifica; **Prelievi:** T0: 60 giorni dopo vaccinazione con virus vivo modificato; secondo prelievo T1: 60 giorni dopo vaccinazione con vaccino spento

Notes: NE: not done; Neg: negative value; Pos: positive value; Dub: dubious value; Asp: aspecific response; **Samples:** T0: 60 days after vaccination with modified live vaccine, T1: 60 days after vaccination with killed vaccine.

Tabella n. 2 Risultati delle indagini virologiche, sierologiche ed immunologiche allevamento M, acclimatemento con soggetti viremici escretori

Table 2: *Virological, serological and immunological results, farm M, direct contact with viremic animals*

Allevamento M (condizionamento)											
Prova eseguita	RT-Real Time PCR			ELISA IgG (s/p > 0.4)			ELISA IFN- γ (> 20 mOD)			ELISA IgA (> 20 mOD)	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T1	T2
Campionamento	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T1	T2
Suino 1	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg
Suino 2	Neg	Neg	Neg	Neg	NE	NE	Neg	NE	NE	NE	NE
Suino 3	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Asp	Neg	Pos	Neg
Suino 4	Neg	Neg	Neg	Neg	NE	NE	Neg	NE	NE	NE	NE
Suino 5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Asp	Pos	Pos
Suino 6	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Suino 7	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Dub	Pos	Neg
Suino 8	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
Suino 9	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Dub	Pos	Pos	Neg
Suino 10	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Dub	Dub	Asp	Neg
Suino 11	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Dub	Pos	Pos	Neg
Suino 12	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Asp	Asp	Pos	Neg
Suino 13	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Dub	Asp	Pos	Pos
Suino 14	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Dub	Neg	Pos	Pos
Suino 15	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Dub	Neg	Neg	Neg

Legenda: **NE:** non eseguito; **Neg:** valore negativo; **Pos:** valore positivo; **Dub:** valore dubbio; **Asp:** risposta aspecifica; **Prelievi:** **T0:** 3 mesi di vita; **T1:** circa 5 mesi di vita, fase di acclimatemento; **T2:** 9 mesi di vita

Notes: **NE:** not done; **Neg:** negative value; **Pos:** positive value; **Dub:** dubious value; **Asp:** aspecific response; **Samples:** **T0:** 3 months old; **T1:** 5 months old; **T2:** 9 months old.