

VALUTAZIONE DELLO SVILUPPO DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA AL VIRUS PRRS: STUDIO DI CAMPO

DEVELOPMENT OF THE IMMUNE RESPONSE TO PRRS VIRUS: A FIELD STUDY

¹DOTTI S., ²GUADAGNINI, G., ²SALVINI F., ¹RAZZUOLI E., ¹FERRARI M.,
¹ALBORALI GL., ¹AMADORI M.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sede di
Brescia; ²DVM, PigVet, Brescia

Parole chiave: PRRS, IFN- γ , infezione di campo

Key Words: PRRS, IFN- γ , field infection

Riassunto. La PRRS si può manifestare con una gravità della sintomatologia differente; questo aspetto sottolinea la complessità di tale patologia. Questa caratteristica determina pertanto una certa discrepanza tra dati ottenuti durante infezioni sperimentali (condizioni controllate) e quelli osservati in allevamenti commerciali. Inoltre, si possono rinvenire isolati differenti, che possono essere caratterizzati da una patogenicità autonoma o dipendente da interazioni microbiche ed ambientali. In questo studio, 60 scrofette, di 28 giorni di vita (T0), sono state osservate in condizioni di campo. I campioni di sangue sono stati prelevati da T0 a T180 e sono stati analizzati per: viremia (RT-PCR), anticorpi (ELISA) e livelli plasmatici di IFN- γ PRRSV specifici (ELISA). Scopo della prova è stato valutare l'evoluzione della risposta immunitaria sia umorale sia cellulo-mediata nei soggetti esposti a contatto naturale con il virus della PRRS. Relativamente ai dati ottenuti, risulta che la risposta immunologica adattativa cellulo-mediata delle scrofette nei confronti di PRRSV in azienda sia peggiore di quella osservata in condizioni sperimentali in animali della stessa età e razza, mantenuti in strutture isolate ed in condizioni controllate.

Abstract. PRRS was shown to occur in many different forms, which underlies the complex pathogenesis of this disease and the accumulation of conflicting reports related to both field trials and protocols of experimental infection. On the whole, the emerging picture outlines a multi-factor disease in which PRRSV strains show different features of pathogenicity and agonist interaction with both microbial and non-microbial environmental parameters. In the present study sixty, 30-day old pigs (T0), were observed under field conditions. Blood samples were collected from T0 to T180 and analyzed for: viremia (PCR), antibodies (ELISA) and PRRSV-specific IFN- γ release (ELISA). In this respect, the central hypothesis of our study was that the adaptive immune responses of pigs to PRRS virus on farm could be worse than those observed under experimental conditions in age and breed-matched animals kept in isolation facilities. In this respect, our results indicate that most pigs develop no PRRS virus-specific IFN- γ response, rather than a delayed and erratic response, observed in models of experimental infection.

INTRODUZIONE. La mancanza di una conoscenza completa dell'interazione tra PRRSV e ospite è una delle cause principali nell'insufficiente controllo della malattia. In particolare, il virus della *Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome* (PRRSV) mostra come entrambe le componenti: infettiva e manageriale (condizioni igienico-sanitarie) giochino un ruolo importante nella manifestazione di una sintomatologia più o meno grave. La variabilità genotipica del virus impedisce un corretto sviluppo/attivazione della risposta immunitaria sia umorale (anticorpi

neutralizzanti) sia cellulo-mediata (secrezione di citochine infiammatorie). Per questo motivo, i metodi diagnostici classici, spesso, non sono sufficienti per una corretta e completa valutazione della risposta immunitaria degli animali. Numerosi studi sono basati sull'analisi di diversi parametri, al fine di trovare il sistema ed il campione biologico più idonei: saliva e plasma come alternativa al siero (3). Essi, infatti, potrebbero essere di ausilio per una migliore comprensione della patogenesi del virus e, quindi, della risposta dell'ospite nei confronti dell'infezione.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare 60 scrofette in condizioni di campo, divise in due gruppi, effettuando prelievi ematici mensili dallo svezzamento a 28 giorni (T0) fino a 180 giorni di vita (T180) per il gruppo 1 e fino a 120 giorni (T120) per il gruppo 2, rispettivamente. Il sangue ottenuto è stato trattato al fine di recuperare sia siero sia plasma per un'analisi dei differenti parametri PRRSV specifici: viremia, anticorpi e IFN- γ .

MATERIALI E METODI. Animali. I soggetti provenivano da un allevamento multisito del Nord Italia. Il sito 1 rappresentato dalle scrofe in fase di gestazione e al parto, suinetti sottoscrofa; sito 2, suinetti in svezzamento (fino a circa 30 Kg); sito 3, suini nella fase di magronaggio-ingrasso (dai 30 ai 170 Kg). Il mangime per le scrofe ed i soggetti in ingrasso era prodotto in azienda, mentre per i suinetti in svezzamento era acquistato all'esterno. I soggetti sono stati sottoposti a misure di immunoprofilassi, effettuate con vaccino inattivato contro: *Porcine Circovirus type II* (18-20 giorni di vita), *Mycoplasma hyopneumoniae* (35-40 giorni di vita); con vaccino vivo attenuato: *Alphaherpesvirus* (come da normativa nazionale). Tutte le scrofe erano vaccinate contro: *Alphaherpesvirus*, *Parvovirus* ed *Erysipelothrix rhusiopathise*. Inoltre, le scrofette erano immunizzate con vaccino vivo attenuato per PRRS ad un peso di 60-70 Kg, nel momento in cui venivano spostate al sito 3. Una volta raggiunti i 140 Kg di peso corporeo, le scrofette erano riportate al sito principale, dopo essere state testate per la presenza di PRRSV (siero) ed anticorpi sia per PRRS sia per malattia di Aukeszky.

Per l'esecuzione dello studio, sono stati individuati due gruppi (1 e 2) costituiti da 30 scrofette da rimonta ciascuno della stessa età e svezzate a 30 giorni di vita. Allo svezzamento (T0), agli animali sono state applicate le marche auricolari e sono stati eseguiti prelievi di sangue (Vacuette, Greiner, Austria) con e senza litio-eparina. Gli animali del gruppo 1 (corrispondenti ai numeri dall'1 al 30) sono stati visitati ed i prelievi di sangue sono stati eseguiti a cadenza mensile per 6 mesi. I soggetti del gruppo 2 (dal 31 al 60) sono stati inclusi nella prova con un secondo arrivo di scrofette, 60 giorni dopo quelle del gruppo 1, e sono state osservate per un totale di 4 mesi con la medesima cadenza mensile dei prelievi ematici. I campioni in totale erano in numero di 331.

Prove di laboratorio. Il siero, ottenuto per centrifugazione dalle provette senza litio-eparina, è stato utilizzato per una valutazione sia dell'immunità umorale (ELISA IgG) sia per la presenza di RNA ascrivibile a PRRSV (RT-PCR). Gli anticorpi IgG nei confronti della PRRS sono stati evidenziati mediante l'utilizzo di kit IDEXX, seguendo le indicazioni del produttore. Per quanto riguarda la valutazione della viremia, è stata impiegata una Real-Time RT-PCR, come descritto in Revilla-Fernandez et al., 2005. Il sangue intero, ottenuto dalle provette contenenti litio-eparina, è stato utilizzato per la quantificazione di IFN- γ plasmatico mediante una reazione di ELISA sandwich (2). Brevemente, la metodica prevede il contatto del sangue intero, rispettivamente, con PRRSV (BS114S, isolato di campo), PBS e lisato di cellule MARC-145 in una piastra a 48 pozzetti in tre pozzetti distinti per ciascun campione. La piastra è stata successivamente incubata per 20 ore a 37°C e 5% di CO₂. Il rilascio di interferon-gamma nei 3 pozzetti è stato poi valutato mediante ELISA *sandwich*. I campioni erano considerati positivi se l'OD corrispondente al sangue intero stimolato con il virus della PRRS era maggiore rispetto a quello non stimolato (PBS) e a quello considerato come stimolo aspecifico (MARC-145), con un valore di riferimento positivo di 50 mOD di differenza.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante test del Chi-quadro (frequenza di reattori positivi nel saggio PCR), analisi della varianza ad 1 via (ANOVA) (titoli di anticorpi sierici).

RISULTATI. Due settimane dopo l'introduzione dei soggetti nel sito 2 (T0), 22 dei 29 soggetti del gruppo 1 sono risultati positivi in PCR, mentre 20 animali hanno presentato IgG specifiche per il virus della PRRS, rilevabili mediante tecnica ELISA. Nei campionamenti successivi tutti gli animali, tranne 1, si sono positivizzati ed hanno mostrato presenza di anticorpi. La prevalenza della viremia tende a diminuire nel gruppo 1 tra il T0 ed il T90, con un aumento tra T90 e T180; al contrario, nel gruppo 2 la prevalenza diminuisce tra T90 e T120 (Chi quadro $p < 0.01$). La presenza di anticorpi IgG ha presentato un aumento significativo tra T90 e T120 in entrambi i gruppi (ANOVA per misure ripetute $p < 0.01$). 331 campioni di sangue intero provenienti da entrambi i gruppi sono stati analizzati nel saggio di rilascio di IFN- γ plasmatico, tra questi 11 non sono stati analizzati, poiché il quantitativo di sangue presente nelle provette non era sufficiente per lo svolgimento delle analisi. Dei 320 campioni rimasti, 4 sono risultati positivi, 19 dubbi ed i restanti negativi. Nella gran parte dei casi i campioni sono stati considerati negativi, in quanto il livello di IFN- γ prodotto dopo contatto con il criolisato cellulare (MARC-145) era maggiore rispetto a quello indotto dal contatto con PRRSV. Pertanto tale dato è stato valutato come una risposta di tipo aspecifico e non correlato all'infezione con l'agente eziologico indagato.

DISCUSSIONE. Le sperimentazioni effettuate hanno evidenziato che gli animali sono venuti a contatto con il virus ed hanno sviluppato una risposta anticorpale, non mostrando, nella gran parte dei casi, una risposta in IFN-gamma virus-specifica.

All'interno dei due gruppi, in particolare nel gruppo 1, vi sono state ondate di infezioni successive, dovute sia alla presenza del virus di campo sia alla vaccinazione (T90-T120); il terzo rilevamento viremico ha coinciso con il ritorno delle scrofette al sito 1, tale fenomeno potrebbe aver rappresentato un agente stressante in grado di riattivare una pregressa infezione. Nonostante questi continui stimoli del sistema immunitario, la risposta nel rilascio di IFN- γ plasmatico PRRSV-specifico è risultata negativa nel gruppo 1, mentre nel gruppo 2 ha evidenziato un aumento di campioni dubbi/positivi al T120, in corrispondenza della vaccinazione contro PRRS. Vista la prevalenza molto bassa di risultati positivi in IFN- γ PRRSV-specifici e l'elevata prevalenza di anticorpi positivi, sono emersi dubbi relativi all'attendibilità del metodo utilizzato (ELISA *sandwich*). Pertanto, al fine di escludere qualsiasi incertezza inerente la procedura, la stessa metodica è stata impiegata per valutare la risposta IFN- γ specifica in suini vaccinati contro *Alphaherpesvirus*. In questo caso, al contrario di quanto osservato per PRRS, la prevalenza di soggetti IFN- γ positivi è risultata assai elevata e, quindi, in linea con la risposta tipica del virus in esame (5).

Da questi dati sembrerebbe emergere un'ulteriore prova della scarsa attivazione della componente cellulare in corso di infezione con PRRSV. Un altro aspetto da prendere in considerazione è rappresentato dalla discrepanza che si rileva tra le infezioni sperimentali e quelle di campo, dove variazioni più o meno evidenti sono imputabili alla presenza di *stressors* ambientali e manageriali (6). Per questo motivo, i dati ottenuti dalla prova possono rappresentare anche una valutazione dei valori sopra menzionati in associazione a condizioni ambientali normalmente presenti in allevamento.

CONCLUSIONI. I risultati emersi da questa prova hanno evidenziato una buona risposta umorale nei confronti del virus della PRRS, come descritto anche da altri (1, 8), ma gli stessi animali non hanno mostrato una risposta di tipo cellulo-mediato, nonostante vi sia stato un contatto ripetuto con l'agente virale (vaccinazione e infezione naturale). Inoltre, la tempistica dell'ultimo contatto

con il virus, poco prima dell'inseminazione delle scrofette e la mancata attivazione del sistema citochinico, è un elemento di particolare rilievo per i possibili effetti negativi sulla successiva gravidanza. La prevalenza altalenante dei soggetti positivi in PCR rispetto alla prevalenza dei soggetti con presenza di IgG specifiche per virus PRRS e la conseguente discrepanza fra i due parametri, risulta in linea con quanto osservato anche da altri autori (9). Tale risultato potrebbe essere imputato ad un differente profilo di replicazione virale e di interazione virus/ospite in momenti successivi dopo l'infezione. Un aspetto interessante è rappresentato dalla valutazione del saggio di rilascio di IFN- γ , dove si nota una mancata risposta PRRSV-specifica; tale risultato è discordante rispetto a quanto evidenziato con dati ottenuti mediante metodica ELISpot (1). Questo dato potrebbe essere dovuto alla differente procedura di esecuzione delle due procedure; tale aspetto andrà pertanto approfondito mediante comparazione tra i due test. In ogni caso, viene messa in luce una scarsa attivazione citochinica, non in grado di limitare l'infezione virale ed il successivo possibile sviluppo della malattia (4). Inoltre, questa scarsa attivazione pone un limite anche all'attività dei vaccini normalmente impiegati in allevamento, con indubbe ripercussioni sulle possibilità di un controllo efficace della malattia (10).

BIBLIOGRAFIA.

- Darwich L., Diaz I., Mateu E. (2010) "Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology". *Virus Res.* 154, 123-132.
- 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.
- Kittawornrat A., Prickett J., Chittick W., Wang C., Engle M., Johnson J., Patnayak D., Schwartz T., Whitney D., Olsen C., Schwartz K., Zimmerman J. (2010) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance?" *Virus Res.* 154(1-2), 170-6.
- Lunney J.K., Benfield D.A., Rowland R.R. (2010) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine". *Virus Res.* 154(1-2), 1-6.
- Małgorzata P.M., Iwona M.D. (2010) "Interferon- γ secretion and proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells after vaccination of pigs against Aujeszky's disease in the presence of maternal immunity". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 58(3), 405-411.
- Murtaugh M.P., Xiao Z., Zuckermann F. (2002) "Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection". *Viral Immunol.* 15, 533-547.
- Revilla-Fernandez S., Wallner B., Truschner K., Benczak A., Brem G., Schmolz 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.
- Sang Y, Rowland RR, Blecha F. (2011) "Interaction between innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus". *Anim Health Res Rev.* 12(2), 149-67.
- Stadejek T., Jablonski A., Chabros K., Skrzypiec E., Pejsak Z. (2011) "Analysis of circulation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in 22 Polish pig farms: implications for diagnosis and control". In: "2011 International PRRS Symposium , Chicago, 2-3 December 2011" 25-26.
- Thanawongnuwech R., Suradhat S. (2010) "Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design". *Virus Res.* 154(1-2), 133-40.