

ANALISI COMPARATIVA DI PARAMETRI IMMUNOLOGICI SIERICI, MUCOSALI E CELLULO-MEDIATI DOPO INFEZIONE DI CAMPO DA VIRUS PRRS (PRRSV)

COMPARATIVE EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE TO A FIELD PORCINE RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE SYNDROME VIRUS (PRRSV) INFECTION IN TERMS OF SERUM AND MUCOSAL ANTIBODY, AND CELL-MEDIATED IMMUNITY

BILATO D.¹, DRIGO M.², PASOTTO D.², AMADORI M.¹

¹Laboratorio di Immunologia cellulare,

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia;

²Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS),

Università degli Studi di Padova.

Parole chiave: immunità, PRRSV, siero, liquidi orali

Key words: immunology, PRRSV, serum, oral fluids

Riassunto

Scopo di questo lavoro è stato confrontare lo sviluppo temporale dell'immunità umorale e cellulo-mediata in 2 gruppi di scrofette PRRS-free introdotte in un allevamento da riproduzione infetto da PRRSV. In particolare, sono stati analizzati anticorpi IgG sierici, IgG ed IgA salivari, risposta cellulo-mediata (test di rilascio di interferon-gamma specifico per PRRSV). Tali parametri sono stati valutati al fine di evidenziare possibili differenze nello sviluppo e nella cinetica della risposta immunitaria nei confronti del virus della PRRS. Le scrofette hanno contratto l'infezione attorno alle 7-9 settimane dall'ingresso in allevamento. Sono emersi in particolare 4 risultati salienti: A) la precocità della risposta Ab nei liquidi orali di gruppo è analoga a quella evidenziata nei sieri; B) buone condizioni di sanità, benessere e conduzione aziendale si associano ad una precoce risposta immunitaria umorale e, soprattutto cellulo-mediata (test IFN-gamma), a differenza di quello che si osserva in allevamenti "problema" per PRRS; C) la risposta cellulo-mediata presenta differenze anche elevate tra soggetti dello stesso gruppo, ma i gruppi tendono a distinguersi chiaramente tra loro rispetto a tale parametro; D) la positività anticorpale nel liquido orale di gruppo viene assicurata anche solo da pochi suini sieropositivi sul totale degli 8-10 soggetti che depositano i liquidi orali. Sono state osservate infine alcune criticità riguardo all'uso del cordino di gruppo per il recupero dei liquidi orali in suini di età > 12 settimane, da affrontare con opportune modifiche del protocollo d'impiego.

Abstract

The aim of this work was to compare the time-course of humoral and cell-mediated immunity in 2 groups of PRRS - free gilts introduced into a PRRSV-infected breeding herd. In particular, we investigated serum IgG antibody, PRRSV-specific IgA and IgG in oral fluids and the cell-mediated response (PRRSV-specific release of interferon-gamma). These parameters were measured in order to identify possible discrepancies in the development and kinetics of the immune response against PRRS virus. Gilts got

regularly infected by PRRSV around 7-9 weeks after entering the farm. 4 results must be highlighted: A) the precocity of the Ab response in oral fluids group was similar to that seen in sera; B) good conditions of animal health, welfare and farm management were associated with an early humoral immune response and cell-mediated immunity, as well (gamma-IFN test), in contrast to what is observed in PRRS “problem” herds; C) the cell-mediated response may be considerably different among subjects of the same group, but each group tends to clearly distinguish itself with respect to this parameter; D) Ab-positive oral fluid samples can derive from a minority of seropositive pigs out of the 8-10 individuals that deposit the oral fluids. Lastly, some problems were reported regarding the use of the cotton rope for collecting oral fluids of pigs aged > 12 weeks. These problems should be dealt with by proper modifications of the applied protocol.

INTRODUZIONE

Nell’ambito delle numerose ricerche volte all’approfondimento delle conoscenze nei riguardi del virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRS), uno dei temi principali è rappresentato dalla risposta immunitaria, da monitorare nell’ambito dei piani correnti di controllo della malattia a livello aziendale. A tale proposito, sono stati recentemente proposti nuovi approcci alla valutazione della risposta immunitaria in campo, tra cui la valutazione degli anticorpi mucosali e la ricerca del virus della PRRS anche nel fluido orale degli animali, nonché un saggio di immunità cellulo-mediata di facile utilizzo ed interpretazione (test di rilascio dell’IFN-gamma su sangue intero, Dotti et al., 2011). In particolare, va sottolineato che l’esecuzione dei test anticorpali su liquidi orali può facilitare notevolmente l’esecuzione dei controlli sanitari per PRRS, riducendo drasticamente i costi e l’impegno logistico ed organizzativo connesso ai prelievi di sangue. Il saggio dell’IFN-gamma ha invece la potenzialità di indicare un compiuto stato di immunizzazione verso PRRSV delle scrofe e delle scrofette nell’ambito dei consueti piani di condizionamento e/o di vaccinazione (Dotti et al., 2013). Pertanto, scopo di questo lavoro è stato valutare la risposta immunitaria di scrofette *PRRS-free* esposte in campo a PRRSV in un’azienda da riproduzione infetta. In particolar modo, è stato analizzato lo sviluppo della risposta immunitaria sierica e di quella mucosale rispetto alle possibili differenze dal punto di vista della precocità, dell’intensità e della durata.

MATERIALI E METODI

Azienda: Lo studio è stato condotto in un’azienda suinicola a ciclo aperto del Veneto il cui target commerciale è la vendita di magroni tra i 30 e i 35 kg di peso vivo. L’effettivo delle scrofe presenti in produzione è di 350-400 animali massimo.

L’allevamento risulta positivo per l’infezione da PRRSV da anni e viene effettuata una vaccinazione della rimonta prima con vaccino vivo attorno ai 140 giorni e quindi richiamato con vaccino spento dopo 3 settimane. La circolazione virale si attesta ad un livello di ipoendemia e dal punto di vista clinico può essere dichiarata una azienda stabile. Altre vaccinazioni che vengono effettuate in allevamento sono quelle contro Malattia di Aujeszky, Influenza, Rinite Atrofica e Parvovirus.

La rimonta è esterna, di circa 40-42 scrofette ogni due mesi, provenienti da un nucleo PRRSV-*free* introdotte all’età di circa 4 settimane.

Le scrofette al loro arrivo vengono messe in capannine interne all’azienda e qui mantenute per almeno 6-7 settimane senza particolari azioni di acclimatemento.

Disegno dello studio: Otto scrofette da rimonta, di 2 gruppi consecutivi, sono state marcate, raggruppate assieme e quindi seguite longitudinalmente ai seguenti tempi:

T1=giorno 1 (giorno seguente all'arrivo in azienda), T2=giorno 49 (uscita dalle capannine), T3=giorno 63, T4=giorno 77, T5=giorno 91 e T6=giorno 105. A ogni prelievo è stato prelevato il sangue senza anticoagulante per ottenere il siero e raccolto il liquido orale di gruppo mediante cordino. Ai tempi T2 e T6 è stata prelevata anche una seconda aliquota di sangue con eparina da utilizzare nelle prove di immunità cellulo-mediata.

Prelievo dei liquidi orali: dopo i prelievi sui singoli animali veniva posizionato un cordino di filo di cotone, sfilacciato all'estremità posta a circa 5 cm di altezza dal grugno degli animali per la raccolta dei liquidi orali. La durata dell'esposizione variava da un'ora per le scrofette campionate a T1 fino ai 20 minuti per quelle campionate a T6 in modo da assicurare un tempo necessario all'imbibizione del cordino senza comprometterne l'integrità. Appena ritirato, il cordino veniva posto in un sacchetto da stomacher, e trasportato in laboratorio a temperatura di refrigerazione.

Processazione dei campioni: i campioni di sangue senza anticoagulante sono stati sierati mediante centrifugazione a 1800 rpm per 10 minuti; il cordino è stato spremuto manualmente e il liquido raccolto centrifugato a 1800 rpm per 10 minuti a 5°C, quindi veniva recuperato il surnatante in provette e congelato a -20 °C in attesa delle analisi.

Analisi di laboratorio: le indagini hanno previsto di valutare la viremia e gli anticorpi specifici sul siero di sangue (rispettivamente, mediante real time RT-PCR, Belfanti et al., 2012, e kit *Herdcheck IDEXX PRRS X3 Antibody Test* Kit, seguendo le istruzioni del produttore), la risposta cellulo-mediata sul sangue intero in eparina (test IFN-gamma, Dotti et al., 2011), nonché la risposta in anticorpi mucosali IgA e IgG nei liquidi orali (LO) di gruppo. Il test gamma-IFN è stato eseguito su campioni di sangue intero previo contatto del medesimo con PRRSV, PBS e criolisato di MARC-145 per 20 ore a 37°C e 5% di CO₂. I campioni erano considerati positivi se l'OD in ELISA per IFN-gamma 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. La lettura della piastra si eseguiva con spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 492 nm. I liquidi orali degli animali sono stati analizzati per valutare la presenza di anticorpi IgA e IgG anti-PRRSV tramite metodica ELISA. È stato adottato il kit IDEXX sopra menzionato. La procedura è stata adattata ai liquidi orali modificando radicalmente i fattori di diluizione dei reagenti, introducendo coniugati anti-isotipo Ig specifici e variando i tempi di incubazione previsti. I due saggi (rispettivamente per IgA e IgG) sono stati inseriti in altrettanti metodi di prova nel Sistema Qualità di IZSLER. RNA è stato estratto da 200 microlitri di siero di sangue o liquidi orali mediante procedura automatica su strumento QIACube della Qiagen.

RISULTATI

Lo stato clinico delle scrofette è rimasto soddisfacente durante il corso dell'intera sperimentazione. Lo stesso vale per i parametri produttivi e riproduttivi dell'allevamento nell'anno in cui è stata eseguita la prova di campo (n. aborti, portata al parto, n. suinetti svezzati / scrofa / anno). Le scrofette in esame sono risultate infette da PRRSV a distanza di 7 e 9 settimane dall'ingresso in allevamento, rispettivamente nei gruppi 1 e 2 (Tabella 1). La cinetica di sviluppo degli anticorpi sierici è risultata in accordo con quella degli anticorpi nei liquidi orali. Il test IFN-g (immunità cellulo-mediata) ha fornito risultati in accordo con i test anticorpali iniziali (Tabella 1). Non è stata invece rilevata alcuna positività al saggio in real-time RT-PCR né nei sieri dei singoli animali né nei liquidi orali di gruppo.

Tabella 1. Risposta Anticorpale (siero e liquido orali) e cellulo-mediata a virus PRRS.
Table 1. Antibody Response (serum and oral fluid) and PRRSV-specific cell-mediated response.

A) Gruppo 1

	Prelievo 1 (g0)	Prelievo 2 (g49)	Prelievo 3 (g63)	Prelievo 4 (g77)	Prelievo 5 (g91)	Prelievo 6 (g105)
Sieri: media s/p	0	0,35	NE	0,92	0,76	0,86
Positivi / totale	0/8	3/8	NE	8/8	7/8	8/8
LO: s/p test IgA	0 (NEG)	0,61 (POS)	NE	0,49 (DUB)	0,87 (POS)	0,75 (POS)
LO: s/p test IgG	0,10 (NEG)	1,83 (POS)	NE	1,04 (POS)	1,16 (POS)	1,06 (POS)
Test IFN-γ Pos + Dub / totale	NE	4/8	NE	NE	NE	0/8

B) Gruppo 2

	Prelievo 1 (g0)	Prelievo 2 (g49)	Prelievo 3 (g63)	Prelievo 4 (g77)	Prelievo 5 (g91)	Prelievo 6 (g105)
Sieri: media s/p	0,01	0,08	0,93	1,11	1,03	NE
Positivi / totale	0/8	1/8 *	8/8	8/8	8/8	NE
LO: s/p test IgA	0,02 (NEG)	0,21 (NEG)	0,91 (POS)	0,53 (DUB)	0,49 (DUB)	NE
LO: s/p test IgG	0,12 (NEG)	0,23 (NEG)	0,84 (POS)	1,09 (POS)	0,86 (POS)	NE
Test IFN-γ Pos + Dub / totale	NE	0/8	NE	NE	NE	NE

LO: liquidi orali. NEG: negativo. POS: positivo. DUB: dubbio. *1 solo campione con s/p 0,4 (valore soglia).
 NE: non eseguito.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Tale ricerca è risultata particolarmente utile al fine della validazione di metodiche ELISA atte a valutare la presenza di Ab specifici contro il virus della PRRS e per un confronto nello sviluppo della risposta umorale e cellulo-mediata.

Il controllo sanitario per la PRRS basato sul prelievo dei liquidi orali si è dimostrato accurato e tempestivo a fronte di un impegno logistico e organizzativo molto ridotto rispetto ai prelievi di sangue sul singolo animale. Inoltre, la rilevazione della risposta anticorpale nei liquidi orali si è dimostrata assai più “robusta” rispetto alla dimostrazione del virus nel siero e nei liquidi orali stessi mediante PCR.

Le condizioni di allevamento stabile per PRRS si è associata ad una dinamica favorevole della risposta immunitaria degli animali con sostanziale accordo tra i parametri anticorpali sierici, mucosali e di risposta cellulo-mediata. In riferimento a tale condizione epidemiologica, ciò suggerisce che il test IFN-g possa essere di utile completamento per il controllo sanitario verso la PRRS del parco scrofe e scrofette. Sulla base dei risultati conseguiti, il monitoraggio sarà esteso ad altri gruppi di scrofette in entrata al fine di confermare ed estendere le indicazioni ricavate dalla prova.

La raccolta dei fluidi orali mediante cordino di gruppo va opportunamente modulata in funzione dell'età degli animali (ovvero della loro mole) sia nei tempi che nelle modalità di esposizione, per assicurare il contatto efficace di tutti gli animali del gruppo e minimizzare gli effetti di competizione spaziale che possono portare ad atteggiamenti di aggressività per la conquista della corda, con possibili rotture e perdite del campione prima del ritiro.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Belfanti I., Mondin A., Drigo M., De Mateo Aznar M., Bortoletto G., Nardelli S., Ceglie L. (2012). Diagnostica virologica di PRRS: studio comparativo tra metodiche biomolecolari classiche ed innovative con campioni ottenuti da un'infezione sperimentale.. In: XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., 143-145, Sorrento (NA) PRRS, PCR, validazione metodi, 24-26 Ottobre 2012.
- 2) 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.
- 3) Dotti, S., Guadagnini, G., Salvini, F., Razzuoli, E., Ferrari, M., Alborali, G.L., Amadori, M., 2013. Time-course of antibody and cell-mediated immune responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus under field conditions. Res. Vet. Sci. Res Vet Sci. 2013 Jun;94(3):510-7.