



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in  
Scienze Medico Veterinarie  
XXX Ciclo

***Studio clinico e immunologico della  
Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS)  
da virus ad alta patogenicità.***

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Attilio Corradi

Tutore:  
Chiar.mo Prof. Paolo Martelli

Dottoranda: Dr.ssa Alessia Catella

Anni 2014/2017

*A chi non si arrende mai!*



## ABSTRACT

## INTRODUZIONE

## PARTE GENERALE

### *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS)*

- Eziologia
- Epidemiologia
- Patogenesi
- Manifestazioni Cliniche
- Diagnosi
- Lesioni anatomo-patologiche
- Immunità
- Prevenzione e controllo

## PARTE SPERIMENTALE

### *Obiettivo*

### *Sperimentazione 1*

#### **Materiali e metodi**

- Virus
- Studio sperimentale
- Valutazioni cliniche
- Valutazioni anatomo-patologiche
  - Esame macroscopico
  - Istologia
  - Immunoistochimica
- Valutazioni virologiche
- Valutazioni immunologiche
- Analisi statistica

#### **Risultati**

- Valutazioni cliniche
- Valutazioni anatomo-patologiche
  - Esame macroscopico
  - Istologia
  - Immunoistochimica
- Valutazioni virologiche
- Valutazioni immunologiche



## ***Sperimentazione 2***

### **Materiali e metodi**

- Virus e vaccino
- Studio sperimentale
- Valutazioni cliniche
- Valutazioni anatomo-patologiche
  - Esame macroscopico
  - Istologia
- Valutazioni virologiche
- Valutazioni immunologiche
  - Sierologia
  - ELISpot IFN-  $\gamma$

Analisi statistica

### **Risultati**

- Valutazioni cliniche
- Valutazioni anatomo-patologiche
  - Esame macroscopico
  - Istologia
- Valutazioni virologiche
- Valutazioni immunologiche
  - Sierologia
  - ELISpot IFN-  $\gamma$

## **DISCUSSIONE e CONCLUSIONI**

## **BIBLIOGRAFIA**



## RIASSUNTO

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) è una malattia endemica nella maggior parte dei Paesi a suinicoltura intensiva nei quali è considerata una delle maggiori cause di danno economico. La malattia colpisce le scrofe, determinando insufficienza riproduttiva e aborto, e i suini in accrescimento, con problemi respiratori, calo dell'incremento ponderale giornaliero e maggiore incidenza di infezioni batteriche secondarie. Negli ultimi venti anni in Nord America, Asia e successivamente in Europa sono emersi nuovi ceppi di PRRSV definiti ad alta patogenicità (HP) e caratterizzati da persistente viremia, elevata febbre ( $>41^{\circ}\text{C}$ ), gravi quadri clinici e alta mortalità in tutte le categorie produttive dell'allevamento.

In questo studio sono state condotte due sperimentazioni su un isolato italiano di PRRSV che in campo si comportava con caratteristiche di alta patogenicità (PRRSV-1 PR40/2014). Nella prima, è stata riprodotta l'infezione sostenuta dall'isolato confrontandola con quella causata da un isolato, sempre di origine italiana, a normale patogenicità (PRRSV-1 PR11/2014), per valutare ed evidenziare le differenze nella virulenza a cui si associano diversi quadri clinici e anatomopatologici. Nella seconda sperimentazione è stata valutata l'efficacia di un vaccino commerciale vivo attenuato MLV PRRSV.1 nei confronti di PRRSV-1 PR40/2014.

I risultati ottenuti dal primo studio hanno confermato una sintomatologia respiratoria grave, febbre elevata e anoressia nel gruppo infetto con PRRSV-1 PR40/2014, evidenziata macroscopicamente da una grave polmonite interstiziale, rispetto al gruppo infetto con PRRSV-1 PR11/2014. Microscopicamente, l'istologia e l'immunoistochimica degli organi linfoidi hanno mostrato una marcata deplezione linfoide, e in alcuni casi, totale atrofia del timo cervicale nei soggetti HP.

Nel secondo studio, i risultati ottenuti hanno mostrato una sintomatologia respiratoria più lieve e una ridotta viremia nei soggetti vaccinati e infetti con PR40-HP rispetto al gruppo HP. I valori degli anticorpi nei soggetti vaccinati sono stati sempre più alti rispetto al gruppo non vaccinato e si è osservato dopo 10 giorni dall'inoculazione del virus un effetto booster che ha mantenuto tali i valori per tutta la sperimentazione.

Le sperimentazioni oggetto della tesi hanno confermato le principali caratteristiche cliniche, virologiche e patologiche di un isolato italiano PRRSV 1.1 ad alta patogenicità,



mettendo in evidenza, attraverso il confronto con un virus a normale virulenza, la gravità del quadro clinico e anatomopatologico. Il vaccino commerciale MVL PRRSV-1 ha fornito una cross protezione parziale nei confronti dell'isolato italiano altamente virulento PRRSV-1 PR40 / 2014.



## ABSTRACT

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is an endemic disease in intensive pig production countries, and it is one of the most important cause of economic damage. The disease affects sows resulting in reproductive and abortion failure, and growing pigs, with respiratory problems, decrease in daily weight gain and higher incidence of secondary bacterial infections. During the last twenty years, outbreaks of new highly pathogenic (HP) PRRSV strains, characterized by persistent viraemia, high fever ( $> 41^{\circ}\text{C}$ ), severe clinical signs and high mortality in all breeding categories have been reported in North America, Asia and later in Europe.

In this study, two experiments on an Italian isolate of PRRSV, with high pathogenicity characteristics (PRRSV-1 PR40 / 2014) in the field were carried out. In the first one, the infection dynamics of the Italian HP- isolate and of Italian normal pathogenicity (PRRSV-1 PR11 / 2014) strain were compared, in order to evaluate the differences in terms of virulence and pathogenicity. In the second experiment, the efficacy of a PRRSV.1 modified-live virus (MLV) commercial vaccine against PRRSV-1 PR40 / 2014 was evaluated.

The comparison results from the first study confirmed the more severe clinical and pathological aspects associated with the PRRSV-1 PR40 / 2014 infection, already described during the outbreak in the field. In particular, severe respiratory symptoms, high fever, anorexia and an interstitial pneumonia were reported in the infected group. Microscopically, histology and immunohistochemistry of lymphoid organs confirmed a marked lymphocyte depletion in HP-infected animals, and in some cases a complete atrophy of the cervical thymus.

In the second study, the obtained results showed a milder respiratory symptomatology and a reduced viraemia in the vaccinated and PR40-infected animals, compared to the NP group. The antibody titres in vaccinated group were higher than in the unvaccinated group, and 10 days after infection a booster was observed.

Both the experiments confirmed the main clinical, virological and pathological features of a highly pathogenic Italian PRRSV 1.1 isolate, highlighting the severity of the clinical and anatomo-pathological pictures. The PRRSV-1 MLV commercial vaccine provided a partial cross protection against the highly virulent Italian isolate PRRSV-1 PR40 / 2014.



## INTRODUZIONE

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) è una malattia endemica nella maggior parte dei Paesi a suinocoltura intensiva. Fino a poco meno di quarant'anni fa, era una malattia la cui eziologia era del tutto sconosciuta e proprio per questo veniva indicata come “malattia dalle orecchie blu” per il classico sintomo di cianosi dei padiglioni auricolari osservato in corso di focolai (Dea et al., 1992). Episodi di aborto e parto prematuro con mortalità neonatale, turbe respiratorie, riduzioni degli incrementi ponderali giornalieri comparvero dapprima negli USA, e dopo un decennio anche in Europa (Germania e Paesi Bassi).

Nei primi anni '90 fu individuato, in Olanda, l'agente responsabile di tale sindrome, che diffondeva rapidamente nel Continente, e fu denominato virus di Lelystad dal nome della cittadina ove i ricercatori isolarono il microorganismo su macrofagi alveolari di suino e ne riprodussero la malattia. La malattia fu definita sindrome riproduttiva e respiratoria del maiale, denominazione ancor oggi in uso. In poco tempo il virus fu isolato anche negli Stati Uniti e denominato VR-2332.

Le perdite economiche dell'industria suinicola legate alla diffusione della malattia rappresentano la maggiore problematica in tutti i Paesi in cui c'è circolazione del virus. Negli anni, diverse ricerche sono state condotte per stimare l'impatto economico della malattia, soprattutto negli Stati Uniti, in quanto rappresenta una delle malattie economicamente più costose della industria suinicola. Inoltre il sistema di produzione americano ben si presta alla conduzione di studi sperimentali perché consiste di una grande e unica unità di allevamento organizzata a settori multipli. In Europa, invece, non solo il sistema produttivo è variabile per la diversità di allevamento (dimensioni e management), ma è anche variabile l'andamento dell'infezione con casi in cui si hanno ingenti perdite economiche e casi in cui l'infezione passa inosservata.

In ambedue i Continenti, poi, la stima dell'impatto economico della malattia risulta essere difficoltosa in dipendenza di diversi fattori, tra cui i principali sono la virulenza dell'isolato virale che infetta gli animali e lo stato immunitario degli animali stessi e di tutto l'allevamento. Si osserva una ampia gamma di manifestazioni cliniche, le cui situazioni estreme sono rappresentate da focolai con una assenza di sintomi



(condizione non molto comune) e focolai con grave sintomatologia che può perdurare per 6-7 mesi.

Ogni episodio di malattia condiziona il costo economico stesso, valutando anche i costi indiretti derivati da spese mediche, mortalità, infezioni secondarie da patogeni endemici in allevamento, e per i suini in accrescimento, il ritardo nell'accrescimento ponderale.

Uno studio americano (Holtkamp et al., 2013) stima che il costo della malattia si aggira intorno ai 664 milioni di dollari/anno, di cui il 45% correlati con la malattia nelle scrofe e il restante 55% correlati con la malattia nei suini in accrescimento.

In Europa, ricercatori olandesi hanno stimato che il costo di un focolaio di PRRS oscilla tra 59 € e 379 € per scrofa allevata, con una media di 126 € per scrofa. A questi costi vanno però aggiunti i costi legati alla prevenzione in allevamento e alle attività diagnostiche, per cui l'impatto economico di un focolaio aumenta.

Il virus PRRS forma due maggiori linee genetiche rappresentate dal genotipo 1 (Lelystad) e genotipo 2 (VR-2332) le cui sequenze nucleotidiche differiscono tra loro del 44% (Allende et al., 1999). Attualmente entrambi i tipi hanno una distribuzione geografica mondiale, con una predominanza del genotipo 1 (PRRS-1) in Europa (EU) e del genotipo 2 (PRRSV-2) in Nord America (NA) e Asia.

L'instabilità intrinseca del genoma virale e la pressione selettiva di allevamento determinano continui cambiamenti genetici che si associano a differenti pattern di virulenza e patogenicità (Murtaugh et al. 2010).

Negli ultimi anni sono stati descritti episodi di malattia di elevata gravità associati ad isolamento di ceppi appartenenti sia al genotipo Nord Americano che Europeo. La prima segnalazione di episodi clinici sostenuti da virus ad elevata virulenza risale al 1996 negli Stati Uniti (Mengeling et al., 1998), dove sono stati descritti gravi episodi riproduttivi, caratterizzati da aborti e mortalità nelle scrofe. Tali quadri sono stati definiti come PRRS acuta, PRRS atipica o sindrome abortigena e mortalità nelle scrofe (SAMS) (Martelli, 2013). Gli isolati erano eterologhi e geneticamente distinti dai virus vaccinali vivi attenuati utilizzati, in particolare appartenevano ai lineaggi 8 e 9 di PRRSV-2 (Shi et al., 2010). Cinque anni dopo un isolato altamente patogeno di PRRSV, definito MN184 è comparso improvvisamente in Minnesota, USA. La sua caratteristica



genetica principale era una tripla delezione discontinua nella regione codificante per la NSP-2 (Han et al., 2006).

A partire dagli anni '90 (Guo et al., 1996), PRRSV ha circolato nel continente asiatico, ma solo nel 2006 è stata descritta, nel Sud –est dell'Asia la cosiddetta “high fever swine disease”, una forma atipica di PRRSV con elevata morbilità e mortalità. I focolai hanno coinvolto più di 2 milioni di maiali causando 400.000 morti in tre mesi (An et al., 2011).

Il sequenziamento dell'intero genoma degli isolati coinvolti nei focolai li ha identificati come nuove varianti di PRRSV-2 (Nord Americano). Tali varianti presentavano inoltre le stesse delezioni nella NSP2 riscontrate nel virus MN184. La forma grave e atipica di PRRS è stata riprodotta in condizioni sperimentali e i ceppi responsabili di forme ad elevata patogenicità in campo sono stati definiti PRRSV ad alta patogenicità (HP-PRRSV) (Tian et al., 2007).

Successivamente poi HP-PRRSV è stato poi isolato anche in Cina, Vietnam, Repubblica Democratica del Laos, Thailandia, Cambogia e India.

In Europa, un isolato di PRRSV-1, sottotipo 3, denominato “Lena” ha provocato, nel 2006 in Bielorussia, focolai di malattia caratterizzati da gravi quadri sistemici e respiratori con una elevata mortalità e un isolato PRRSV-1, sottotipo 2, denominato “BOR” ha mostrato una maggiore virulenza rispetto al sottotipo 1 (Karniychuk et al., 2010). Più recentemente in Belgio è stato isolato un virus ad elevata patogenicità (Friday et al., 2015) PRRSV 1, sottotipo 1 (prototipo 13V091) da suinetti post-svezzamento con sintomi respiratori, febbre elevata e anoressia.

Nel 2014 si è verificato, in Italia, un episodio di PRRS sostenuto da un ceppo “atipico” in cui si sono osservati allo svezzamento gravi sintomi respiratori e sistemici (anoressia, persistente febbre elevata), con una mortalità post-svezzamento superiore al 50%.

Lo scopo degli studi che sostengono questa tesi di dottorato è volto a valutare le caratteristiche cliniche e immunologiche di un isolato della Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome ad elevata patogenicità (HP-PRRSV).



## PARTE GENERALE

### ***PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS).***

#### **EZIOLOGIA DELLA PRRS**

Il virus della PRRS è classificato nell'ordine *Nidovirales*, famiglia *Arteriviridae* assieme al virus dell'arterite equina (EAV), della lattico-deidrogenasi (LDV) e della febbre emorragica delle scimmie (SDHF). PRRSV è un piccolo virus dotato di envelope, costituito da un singolo filamento di RNA. Il virione include il genoma a RNA di approssimativamente 15 kilobasi in un nucleocapside di natura proteica, circondato da envelope contenente lipidi con 5 o 6 proteine strutturali. I virioni sono piccoli, sferici pleomorfi (di 50-70nm di diametro) con una superficie protettiva. Il virus è stabile in coltura, siero e omogenati di tessuto ad una temperatura di -70°C. All'aumentare della temperatura la sua capacità di sopravvivenza decresce rapidamente. A temperatura ambiente il virus è inattivato dopo contatto con una soluzione allo 0,03% di cloro per 10 minuti, con una soluzione di iodio allo 0.0075% e di sali di ammonio quaternario allo 0.0063% per un minuto (Mengeling et al.,2000).

Il virus della PRRS cresce su macrofagi di suino di origine polmonare e di derivazione dal tessuto linfatico nonché sulle cellule dendritiche. La coltivazione in laboratorio avviene sui macrofagi alveolari isolati da giovani suini o da cellule renali di scimmia specialmente la linea cellulare MA-104 e suoi derivati, le MARC-145. Gli isolati appartenenti al tipo 1 crescono più facilmente sui macrofagi alveolari mentre quelli del tipo 2 si adattano facilmente alle altre colture cellulari dopo alcuni passaggi (Martelli et al.,2013). La caratterizzazione di molecole di superficie della cellula ospite coinvolta nell'infezione da PRRSV, segnatamente CD163 e sialoadesina, ha portato allo sviluppo di linee cellulari PK-15 e CHO che sono permissive nei confronti degli isolati di campo di entrambi i tipi virali. La diversità di comportamento rispetto alla coltivazione su cellule indica l'esistenza di una variabilità biologica del virus che talvolta rende difficile la propagazione *in vitro* di alcuni isolati di PRRSV.

L'organizzazione del genoma è simile a quella degli altri Arterivirus e consiste in circa 15.000 nucleotidi organizzati in nove Open Reading Frame (ORF). ORF1a e 1b comprendono circa l'80% del genoma. Essi codificano per 12 proteine non strutturali



(NSPs) coinvolte nella replicazione e nella trascrizione virale. La restante parte del genoma, ORF2, 2b e 3-7, codifica per le proteine strutturali. ORF 2, ORF3 e ORF4 codificano per proteine associate al virione (GP2, GP3 e GP4, rispettivamente) mentre ORF5, 6 e 7 per proteine dell'envelope (GP5 o E), della membrana (M) e del nucleocapside (N) (Balka et al., 2010). La regione che più frequentemente viene sequenziata è il gene ORF5, costituito da 603 nucleotidi, che codifica per la glicoproteina maggiore dell'envelope (GP5) di 201 aminoacidi (Meulenbergh et al., 1998). La sequenza dell'ORF 5 mostra un'elevata variabilità utile nella differenziazione degli isolati virali ma che, allo stesso tempo può rappresentare un fattore limitante soprattutto in termini laboratoristici. A causa di questa "ipervariabilità" di ORF5, in alternativa o in associazione, viene eseguito il sequenziamento di una porzione genomica più conservata, sebbene altrettanto variabile, l'ORF7 (Martelli, 2013).

L'analisi filogenetica, basata sull' ORF 5, ha dimostrato che sia all'interno del tipo 1 che del tipo 2 è presente una ampia variabilità tra gli isolati. Il confronto della sequenza nucleotidica ha messo in evidenza una variabilità che raggiunge anche il 30% delle basi all'interno del genotipo 1 (EU) e che supera il 21% nel caso del tipo 2 (NA). L'analisi genetica basata sull'ORF 7 di un numero di isolati PRRSV-1 suddivide il genotipo EU in quattro sottotipi: Pan-Europeo sottotipo 1 (Lelystad virus-like), geograficamente presente prevalentemente nell'Europa Occidentale e tre diversi sottotipi nell'Europa Orientale, sottotipo 2, 3, 4 (Stadejek et al., 2013).

Il genotipo 2 annovera nove diversi gruppi genetici, di cui sette sono predominanti in Nord America e due sono costituiti esclusivamente da isolati dell'estremo Oriente asiatico. Entrambi i gruppi genetici hanno tratto la loro origine precedentemente alla comparsa del virus responsabile della pandemia negli USA.

La variazione genetica dell'ORF 5 o di altri ORF degli isolati del virus PRRS non è associata a chiare differenze fenotipiche degli stessi. L'importanza di confrontare le sequenze degli ORF permette di fare esclusivamente una valutazione della correlazione genetica tra isolati per differenziare virus residenti da quelli di nuova introduzione, per determinare la velocità di cambiamento degli isolati, per comprendere le fonti di epidemie, senza comunque fornire alcuna informazione circa le proprietà biologiche



principali quali la capacità di causare malattia, di indurre immunità, di protezione crociata.

PRRSV mostra variabilità nel tropismo d'organo e quindi nella capacità di determinare preferenzialmente la malattia riproduttiva o quella respiratoria; alcuni isolati di campo hanno mostrato marcata neurovirulenza in suinetti neonati con dimostrazione del virus in macrofagi e microglia cerebrali (Allende et al., 2000). L'esistenza di una marcata differenza antigenica tra isolati pone problemi di protezione crociata in campo quando avvengono infezioni da isolati diversi e di mancato successo delle misure di controllo. PRRSV varia per la capacità di determinare lesioni polmonari e la loro gravità. Alcuni isolati causano forme subcliniche con modificazioni anatomo-funzionali di modico grado mentre altri determinano malattia grave con lesioni polmonari interstiziali rilevanti. Una differente virulenza tra isolati si associa ad alti livelli di replicazione negli animali infetti; vi è una associazione diretta tra quantità di virus in polmoni, linfonodi e tonsille e virulenza. Inoltre, isolati a maggiore virulenza possono diffondere più agevolmente e per tempi più lunghi.

La caratteristica genetica principale degli isolati emergenti ad alta virulenza/alta patogenicità (HP-PRRSV) di entrambi i genotipi è la presenza di delezioni discontinue nella regione che codifica per la NSP 2; tale regione è una delle più variabili del genoma virale, ed è essenziale per la replicazione virale tanto da essere considerata un importante gene per monitorare l'evoluzione genetica e epidemiologica del PRRSV (Bautista et al., 1996; Fang et al., 2007; Gao et al., 2004; Han et al., 2006; Ropp et al., 2004; Yoshii et al., 2008). Il gene NSP2 ha la capacità di evolversi rapidamente sotto stimolo della pressione selettiva del sistema immunitario dell'ospite (Chen et al., 2010). Negli ultimi anni, studi recenti hanno dimostrato una relazione tra la variazione NSP2 e alcune proprietà biologiche del PRRSV, come virulenza, patogenicità, tropismo d'organo, capacità di diffondersi nei tessuti (Chen et al., 2009; Wang and Zhang, 2014; Wang et al., 2013).



## EPIDEMIOLOGIA

Il virus della PRRS si caratterizza per la bassa contagiosità e l'alta infettività. Ciascun isolato può variare in relazione alle caratteristiche del virus stesso, per cui esistono virus con una maggiore infettività rispetto ad altri. L'elemento epidemiologico più rilevante della PRRS è la condizione di persistenza dell'infezione. Le sedi elettive di persistenza sono tonsille e tessuto linfoide (Duan et al., 1997), ma studi sperimentali in campo hanno dimostrato che il virus può localizzarsi anche in strutture non abituali (bulbo pilifero, umori oculari, ecc.), peraltro non accessibili *in vivo*. Altri studi hanno dimostrato che tra 150 e 190 giorni post-infezione circa il 10-30% dei campioni di tessuto linfoide è ancora PCR positivo per il virus.

Gli animali infetti diffondono il virus con la saliva, le secrezioni nasali, le urine, il seme, il colostro, il latte e occasionalmente le feci. La quantità di virus che viene eliminata con le secrezioni organiche dipende dalle sue caratteristiche intrinseche. La trasmissione può avvenire direttamente tra animale infetto e animale sano per via intranasale, intramuscolo, orale, intrauterina, vaginale e parenterale; la via di esposizione influenza la dose necessaria a determinare l'infezione. La dose infettante il 50% degli animali esposti al virus ( $ID_{50}$ ) per via orale è di  $1 \times 10^{5,3}$  TCID<sub>50</sub> mentre per via intranasale sono necessarie  $1 \times 10^{4,0}$  TCID<sub>50</sub> (Meulenbergh et al., 1998). Per via intramuscolare oltre che a seguito della somministrazione di farmaci, il virus può essere trasmesso tramite ferite conseguenti a morsi, morsicature della coda e delle orecchie, tagli e abrasioni secondarie a interazioni aggressive tra soggetti. L'infezione può avvenire anche per via parenterale attraverso soluzioni di continuo della cute procurate in occasione delle usuali pratiche di allevamento quali il taglio della coda e dei denti, dell'applicazione di tatuaggi identificativi.

Il virus della PRRS si trasmette anche per via transplacentare, da scrofa viremica ai feti. A seguito dell'infezione dei feti *in utero* consegue la morte fetale o la nascita di suinetti viremici (meno frequentemente suinetti non-viremici). I neonati viremici più spesso presentano spiccati caratteri di disvitalità, destinati quindi a contribuire precocemente alla mortalità neonatale. Altri suinetti appaiono normali, vivi e vitali. I suinetti viremici per infezione in utero sono definiti Long Term Viremic Pigs (LTVPs – viremici a lungo termine) data la maggiore durata della viremia rispetto ai soggetti in cui l'infezione è



avvenuta per via orizzontale. I LTVPs rappresentano un importante elemento della diffusione di PRRSV poiché, analogamente ai soggetti che s'infettano nel periodo neonatale per contatto diretto con le secrezioni orali o, più frequentemente, per assunzione di colostro o latte infetto, sono responsabili di trasmissione dell'infezione e del suo perdurare nella fase produttiva post-svezzamento (Martelli et al., 2013).

La diffusione del virus della PRRS attraverso il seme è motivo di particolare attenzione per l'elevato impiego dell'inseminazione artificiale (IA), in quanto la sua eliminazione attraverso il materiale seminale è intermittente. Un reperto negativo in PCR per PRRSV del seme di un verro sieropositivo non esclude la possibilità che in tempi diversi e non conosciuti vi possa essere una diffusione del virus tramite il seme. Perciò un centro verri deve garantire la distribuzione di seme negativo per PRRSV (intera popolazione sieronegativa) o qualora, vi sia sieropositività, si devono eseguire controlli per la ricerca del virus mediante PCR su tutti gli eiaculati ottenuti e destinati alla preparazione di dosi destinate alla IA.

La trasmissione indiretta avviene mediante contatto dell'animale suscettibile con materiale e personale addetto all'allevamento contaminati (stivali, attrezzature per il governo, contenitori, lettiera, aghi infetti e strumenti chirurgici) (Cho and Dee, 2006). Anche mosche e zanzare possono fungere da vettori di PRRSV. La trasmissione indiretta per via aerosolica, anche a distanza, dipende dall'isolato implicato e da fattori di rischio ambientali quali la direzione dei venti, le basse temperature, l'elevata umidità relativa e le poche ore di luce solare diurna, fattori propri del periodo invernale, per cui la trasmissione indiretta del virus, in questa stagione è più probabile (Desrosiers and Boutin, 2001).

La trasmissione tra allevamenti avviene principalmente per effetto dell'introduzione di animali infetti, seme contaminato e da allevamenti vicini per via aerosolica. Il rischio di infezione aumenta all'aumentare delle densità di popolazione suina nel territorio e si riduce all'aumentare della distanza tra allevamenti. Infatti, il rischio di infezione entro 500 metri di distanza tra allevamenti risulta essere alto, mentre già ad un kilometro questo si riduce considerevolmente. Anche la movimentazione degli animali attraverso mezzi di trasporto non adeguatamente sottoposti alle pratiche di disinfezione può



favorire l'introduzione del virus. Analogamente, il non rispetto delle misure di biosicurezza è riconosciuta come causa frequente di infezione di una unità produttiva. All'interno di uno stesso allevamento, l'infezione endemica è mantenuta dalla presenza contemporanea di soggetti persistentemente infetti e di animali suscettibili, acquistati da fonti esterne o per perdita dell'immunità protettiva. Il virus pertanto si perpetua per effetto della trasmissione verticale e orizzontale sia neonatale (scrofa - suinetto) che durante tutte le fasi successive della vita. Il periodo post-svezzamento (9-10 settimane di età) è il momento di maggiore criticità per la trasmissione orizzontale, tanto che la maggior parte della popolazione si infetta rapidamente in questa occasione, determinando rilevanti ripercussioni cliniche e produttive. PRRSV può diffondere anche all'interno della popolazione adulta dell'allevamento, generando problemi riproduttivi ricorrenti.

Gli episodi di PRRS sostenuti da isolati ad alta patogenicità, sono caratterizzati da elevata morbilità (100%) e mortalità. I valori di mortalità aumentano notevolmente in corso di tali episodi, raggiungendo il 100% nella fase neonatale, il 70% nella fase di post-svezzamento e il 20% nella fase di ingrasso. Nelle scrofe si possono avere valori di mortalità di circa il 10% in associazione anche al 50% di aborti (SHCi, 2016). In corso di focolai epidemici causati da virus a bassa/normale virulenza, la mortalità nelle scrofe non supera il 4%, la mortalità neonatale raggiunge il 60% e nelle fasi di accrescimento può raggiungere il 20%.

## **PATOGENESI**

Dopo l'esposizione, il virus replica nei macrofagi permissivi della sede di ingresso, diffondendo rapidamente nel tessuto linfoide e al polmone. Il tropismo verso agli altri tessuti non è particolarmente spiccato. La viremia, così come la localizzazione nel tessuto linfoide e polmonare, si realizza entro 12-24 ore dall'infezione e raggiunge il picco di massimo titolo in 7-14 giorni: è questa la fase in cui si ha coincidenza tra malattia e comparsa delle lesioni linfoidee e polmonari. Dopo aver raggiunto il picco, il titolo virale inizia a decrescere tanto che a 28-35 giorni post-infezione il virus non è più rinvenibile nel sangue. Nei soggetti LTVPs, infetti in *utero*, la viremia ha una durata



superiore (circa 48 giorni) e, parimenti, anche lo stato di portatore persistente si può protrarre sino a oltre 7 mesi di età (Martelli, 2013).

Gli isolati ad alta patogenicità presentano un tropismo di organo più ampio rispetto a quelli a normale virulenza, avendo la capacità, anche, di superare la barriera ematoencefalica e di indurre danni al sistema nervoso centrale. Essi determinano alti livelli virali a carico della mucosa nasale con ripercussioni sia sulla trasmissione aerogena e sia sulla trasmissione per contatto diretto; hanno la peculiarità di raggiungere livelli di viremia anche 10 volte superiori rispetto agli isolati a bassa virulenza/patogenicità e di raggiungere livelli virali 1000 volte più grandi nel tessuto polmonare e linfatico.

Il virus replica nelle cellule differenziate della linea monocitaria (principalmente i macrofagi polmonari alveolari, i macrofagi polmonari intravascolari) che esprimono un recettore glicoproteico, la sialoadesina, ed una lipoproteina transmembranaria denominata CD163. La sialoadesina lega il virus e ne favorisce l'entrata grazie ad un processo di endocitosi mediato da recettore, mentre CD163 è essenziale per il rilascio del virus internalizzato dall'endosoma al citoplasma, prerequisito per la replicazione. I virus ad alta virulenza/patogenicità non replicano soltanto nelle cellule con fenotipo CD163<sup>+</sup>sialoadesina<sup>+</sup> ma anche in altre, utilizzando recettori di entrata addizionali (Van Breedam et al., 2010).

La replicazione virale induce lesioni per effetto di apoptosi delle cellule infette e contigue, induce secrezione di citochine pro-infiammatorie e attivazione di cellule B-policlonali, riduce la fagocitosi ed uccisione batterica ad opera dei macrofagi. Zimmerman et al., 2012). Vengono inoltre attivati meccanismi di immunomodulazione quali l'aumento delle citochine ad attività immunoregolatoria/soppressiva (Martelli et al., 2013). L'aumento dei livelli di citochine infiammatorie ha sia effetti positivi quali il richiamo di leucociti, l'inizializzazione di una risposta immunitaria ed il tentativo di una riduzione della replicazione virale, che negativi come l'aumento della permeabilità vascolare a livello polmonare, facilitando la comparsa di edema polmonare e broncocostrizione. Infatti, interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , interleuchina IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12 risultano aumentate nel liquido bronco-alveolare. Recenti studi hanno dimostrato che isolati differenti di PRRSV influenzano in maniera differente i meccanismi patogenetici IFN tipo I-dipendente, come l'attività pro-infiammatoria (TNF-



$\alpha$ , IL-1, IL-8) e la ratio IFN- $\gamma$ /IL-10 (Diaz et al., 2012; Darwich et al., 2011; Gimeno et al., 2011, Ferrari et al., 2013; Martelli et al., 2009). Negli ultimi anni, è stato messo in evidenza che gli isolati HP-PRRSV replicano primariamente nel timo (Butler et al., 2014), inducendo linfopenia e atrofia timica con conseguente disfunzione della sistema immunitario dell'ospite.

## **MANIFESTAZIONI CLINICHE**

La sintomatologia varia considerevolmente, acquisendo quadri asintomatici/subclinici sino a manifestazioni acute di estrema gravità per morbilità, talvolta associati anche a elevata mortalità. L'ampia variabilità dei quadri clinici è funzione sia di fattori intrinseci del virus sia di fattori di management aziendale.

PRRSV ha differenti caratteristiche di virulenza/patogenicità, in grado di modulare il tropismo d'organo (riproduttivo piuttosto che respiratorio), gli aspetti clinici, soprattutto in termini di gravità, l'entità delle lesioni anatomiche e funzionali, i livelli di viremia e di localizzazione nei tessuti bersaglio, influenzandone così anche la diffusione e trasmissione. La diffusione del virus all'interno della popolazione è influenzata anche da condizioni ambientali e manageriali quali ad esempio la gestione dei flussi di animali. Le dimensioni dell'allevamento modulano la gravità e durata dei sintomi, più grande è la popolazione maggiore è di solito l'entità della malattia. Lo stato immunitario della popolazione in relazione ad una precedente esposizione allo stesso virus (omologo) o ad uno diverso (eterologo) o alla vaccinazione con virus attenuato può considerevolmente modificare il pattern clinico della sindrome soprattutto in termini d'incidenza della malattia (protezione crociata parziale). La presenza di co-infezioni condiziona significativamente l'espressione della malattia soprattutto della forma respiratoria e sistemica quando, data l'aumentata suscettibilità dell'animale infetto da PRRSV, le infezioni batteriche e virali, trovano una condizione ottimale per esplicare i loro effetti, determinando un'azione sinergica.

Quando un virus infetta una popolazione completamente recettiva nei suoi confronti per assenza d'immunità specifica (anche nel caso di entrata in un allevamento endemico di un "nuovo" virus, diverso da quello "residente") si ha una forma epidemica, la cui prima fase ha una durata di non meno di 2-3 settimane caratterizzata



dalla comparsa di anoressia e letargia (10-80% della popolazione) (Martelli et al., 2013). La propagazione della sintomatologia avviene lentamente in funzione della consistenza numerica della popolazione interessata e della sua composizione. Ad anoressia e letargia si associa febbre (sino a 41°C), iperpnea, cianosi alle estremità; nel singolo soggetto i sintomi sistemici perdurano anche per 5-7 giorni. La seconda fase dell'episodio epidemico può durare anche 1-4 mesi ed è caratterizzata da turbe riproduttive nelle scrofe che hanno contratto l'infezione con viremia nel terzo trimestre della gestazione oltre ad un aumento significativo della mortalità pre-svezzamento. Al termine di questa fase (cessazione del focolaio riproduttivo e ritorno ai valori di mortalità neonatale) subentra la forma endemica.

Nelle scrofe il quadro prevalente e maggiormente indicativo della sindrome è rappresentato dall'aborto e dal parto prematuro. Nelle scrofe lattanti compare agalassia con la inevitabile conseguenza dell'incremento di mortalità neonatale. Le scrofe infette, che non abortiscono e che pertanto partoriscono, anche anticipatamente, danno alla luce neonati apparentemente normali, assieme a soggetti deboli e disvitali, di taglia variabile con prevalenza di sottopeso, in associazione a feti morti a ridosso del parto o durante la fase espulsiva, talvolta autolitici (brunastri) o mummificati, parzialmente o completamente. I suinetti appartenenti a queste nidiate appaiono emaciati, ipotermici, spesso colpiti da slay-leg, con iperpnea/dispnea; possono anche sopravvenire emorragie ombelicali, aumento dell'incidenza di poliartriti e meningiti. Nei suinetti in fase post-svezzamento ed accrescimento l'infezione è seguita da anoressia, letargia, cianosi, dispnea, tosse, arruffamento delle setole e riduzione degli accrescimenti. L'incidenza delle patologie tipiche della fase produttiva aumenta; in particolare, si segnala un aumento dell'incidenza delle polisierositi da *Streptococcus suis* e da *Haemophilus parasuis* (Malattia di Glässer), delle broncopolmoniti, dell'epidermite essudativa e delle forme setticemiche salmonellari (Zimmerman et al., 2012).

Nel verro la malattia decorre spesso inosservata, manifestando una forma paucisintomatica con comparsa di febbre transitoria, appetito capriccioso, lievi segni respiratori. Si può osservare una riduzione della libido con scadimento della qualità del seme che, per la estrema transitorietà, raramente suscitano il sospetto di PRRS. È



importante sottolineare che l'eliminazione di PRRSV con il seme è intermittente e prolungata nel tempo e che è causa di trasmissione venerea dell'infezione.

Negli allevamenti con infezione endemica, le manifestazioni cliniche interessano esclusivamente le sottopopolazioni suscettibili, principalmente i soggetti in fase post-svezzamento e accrescimento quando vi è il declino dell'immunità colostrale, le scrofette di rimonta in caso di non idoneo acclimatemento e le scrofe che non hanno contratto l'infezione in precedenza. Nelle femmine adulte si registrano i sintomi specifici a carico della sfera riproduttiva, variabili rispetto alla fase di gestazione. Tali episodi hanno un andamento temporale continuo e a lenta risoluzione nella popolazione con tendenza a riproporsi nel tempo come "mini focolai riproduttivi".

In corso di focolai epidemici di HP-PRRSV, il quadro clinico appare più grave e colpisce soggetti di tutte le età, ed è caratterizzato da elevata febbre (al di sopra dei 40°-42°C), segni neurologici, tremori, petecchie, rash cutaneo eritematoso. Si osservano una profonda depressione e letargia, anoressia, sintomi respiratori più marcati, talora zoppia, diarrea alternata a costipazione ((Zhou et al., 2010).

## DIAGNOSI

Il sospetto di malattia sostenuta dal PRRSV deve essere considerato ogniqualvolta vengano registrate turbe della riproduzione nei quadri clinici sopra descritti nonché malattia respiratoria endemica oltre ad aumento della mortalità neonatale e, in particolare, nel periodo post-svezzamento. In considerazione del fatto che, in allevamento, il quadro clinico spesso è aggravato dagli effetti delle infezioni batteriche secondarie, l'approccio diagnostico deve prevedere il supporto di tecniche di laboratorio per confermare la presenza del virus (diagnosi diretta) che di anticorpi (diagnosi indiretta) (Martelli et al., 2013).

Inoltre, si deve ricordare che l'assenza di manifestazioni cliniche riferibili alla PRRS non significa che il virus non sia presente in allevamento e che ci sia uno *status* di indennità, pertanto l'esecuzione di monitoraggi periodici sullo stato della popolazione nei confronti di PRRSV deve essere raccomandato.

La diagnosi diretta si basa sull'isolamento virale e sulla dimostrazione del virus mediante tecniche molecolari (PCR). Il virus infettante, pertanto isolabile o come



materiale genetico virale (RNA), può essere rinvenuto nel sangue dopo 4-7 giorni dall'infezione, in concomitanza con l'acme delle manifestazioni cliniche, per un periodo di 4 (massimo 6) settimane. Successivamente può essere dimostrato nei liquidi bronco-alveolare e salivare, dalle tonsille e dai linfonodi per diverse settimane dalla scomparsa della viremia. È buona norma sottoporre l'isolato virale a RT-PCR o tecniche di immunofluorescenza (IF) o di immunisto chimica (IIC) per confermare l'Antigene virale. L'utilizzo della microscopia elettronica può risultare utile allo scopo, anche se non è di facile esecuzione. Si rammenta che l'isolamento virale mal si presta a essere applicato al materiale seminale, pertanto il seme viene processato mediante RT-PCR. Nel caso di monitoraggio dei centri verri indenni, il cui obiettivo è di indentificare le infezioni precoci, il seme può risultare PCR positivo dopo 24-48 ore dall'infezione, per cui viene eseguito un controllo da sangue intero prelevato mediante puntura di vaso periferico, ad esempio auricolare, e raccolto su tampone. Il prelievo del materiale da sottoporre a PCR dovrebbe avvenire, idealmente, 3 volte alla settimana.

In tempi più recenti, con finalità di sorveglianza di popolazioni non infette al fine di confermare la persistenza dello *status* di negatività o di individuare precocemente l'avvenuta infezione, è entrata in uso l'esecuzione della PCR da campioni di fluido salivare raccolto mediante l'impiego di cordame che, posto all'interno di un box, viene masticato dai componenti dal gruppo ospitato. Un intervallo di prelievo di 2-4 settimane sembra ottimale allo scopo.

Il cDNA ottenuto dalla RT-PCR può essere sottoposto all'analisi di sequenziamento di un ORF, comunemente ORF 5, insieme o in alternativa a ORF 7, allo scopo di ottenere la sequenza nucleotidica dell'isolato e di permetterne il confronto con altre sequenze presenti nei data-base o precedentemente ottenute dallo stesso allevamento. Le finalità del sequenziamento, quindi, sono essenzialmente epidemiologiche, vale a dire per verificare la presenza di nuovi isolati all'interno di una popolazione causa di episodi epidemici di PRRS o per differenziare un virus vaccinale (MLV) da un isolato di campo.

L'indagine sierologica, volta alla ricerca di anticorpi specifici nel siero di sangue o, come più recentemente, nel liquido salivare, viene applicata nell'ambito diagnostico a seconda della tipologia di allevamento e nell'ambito della sorveglianza della malattia. In allevamenti sieropositivi per infezione naturale o vaccinazione, la sierologia non è un



valido strumento diagnostico in corso di manifestazioni cliniche. I test sierologici non sono in grado di differenziare gli anticorpi evocati da infezione recente, reinfezione o vaccinazione. Nel caso di allevamenti sieronegativi, il doppio campionamento, acuto e convalescente, può acquisire un significato diagnostico quando si registra una sieroconversione da negativo a positivo.

Il test di riferimento è basato sulla metodica ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay dotato di alta sensibilità e specificità, è standardizzato e di rapida esecuzione e ben si presta, quindi, all'impiego nella routine diagnostica. Gli anticorpi che vengono misurati con questa tecnica compaiono precocemente rispetto all'infezione (nella seconda settimana post-infezione), raggiungono il loro picco a circa 1 mese e tendono a declinare gradualmente fino a valori negativi in tempi variabili da 4 a 12 mesi post-infezione. Pertanto, l'animale che ha contratto l'infezione sviluppa anticorpi ELISA, risultando sieropositivo, ma nell'arco temporale di un massimo di 12 mesi riacquisisce lo status di "sieronegatività".

Un altro test che presenta un'alta specificità è la siero-neutralizzazione (SN), anche denominata virus-neutralizzazione (VN): essa individua la massima diluizione del siero in cui sono presenti gli anticorpi neutralizzanti che inibiscono gli effetti del virus in coltura cellulare. Tale test trova un impiego molto limitato in diagnostica in quanto gli anticorpi siero neutralizzanti compaiono tardivamente (non prima di 1 mese dall'infezione), raggiungono il loro picco massimo nel terzo mese post-infezione, e l'intensità della risposta è massima nel caso di omologia con il virus utilizzato per il test. Inoltre non è stato oggetto di standardizzazione tra i diversi laboratori e quindi viene utilizzato quasi esclusivamente a scopo di ricerca.

## **LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE**

La gravità ed estensione delle lesioni è funzione della virulenza dell'isolato implicato. Gli organi maggiormente interessati sono il polmone e i linfonodi, sedi preferenziali della replicazione virale. A carico del polmone, il quadro macroscopico predominante è caratterizzato da polmonite interstiziale: il parenchima è elastico, lievemente consolidato, umido e con colorazione grigiastra. Nei casi di maggiore gravità, esso appare chiazato, con colorazione rossastra, di consistenza gommosa. Da un punto di



vista microscopico si osservano setti alveolari infiltrati di macrofagi, linfociti e plasmacellule, delimitati dagli pneumociti di tipo II iperplastici. Gli alveoli contengono macrofagi necrotici, detriti cellulari, e liquido sieroso. I linfociti e le plasmacellule si dispongono attorno alle vie aeree e ai vasi ematici. Questi quadri vengono sovrastati dagli effetti delle frequenti complicanze batteriche e virali. Le lesioni linfonodali si instaurano pressoché contemporaneamente a quelle polmonari (Marcato, 2015). Macroscopicamente i linfonodi appaiono aumentati di volume, edematosi, di colore brunastro e moderatamente consolidati nelle fasi iniziali. In seguito, aumenta la consistenza e la colorazione biancastra, con un pattern nodulare o diffuso. Le lesioni microscopiche interessano le strutture germinative, necrotiche e deplete, mentre le strutture corticali possono presentare cisti contenenti liquido proteinaceo, linfociti e cellule multinucleate.

Si possono osservare nelle scrofe infette endometriti, miometriti e lesioni placentari; una lesione indicativa di PRRS è rappresentata da un ingrossamento del cordone ombelicale, edematoso ed emorragico nei feti abortiti e nei nati morti. Questi ultimi sono comunemente ricoperti di materiale brunastro costituito da meconio e liquido amniotico che, pur non essendo patognomonico, è indicativo di ipossia fetale (Martelli, 2013).

Nei casi sostenuti da isolati altamente patogeni, i quadri macroscopici prevalenti presentano, oltre la polmonite interstiziale, abbondanti quantità di essudato nelle cavità organiche, lesioni fibrinoso-emorragiche multi-organo diffuse e gravi, infarto splenico, vescica dilatata contenente urine di color marrone, putrefazione del muscolo cardiaco, focolai giallo-biancastri di necrosi epatica, artriti e ulcere intestinali, ma le frequenti co-infezioni virali in vivo rendono l'interpretazione clinica e il rilevamento di lesioni patognomoniche complicato e difficile (Li et al., 2012). Istologicamente, le lesioni appaiono più gravi se confrontate con quelle indotte da un isolato a normale patogenicità: studi sperimentali hanno dimostrato totale o parziale alterazione del parenchima polmonare con intensa infiltrazione interstiziale di cellule infiammatorie ed eritrociti, accumulo intra-alveolare di abbondante essudato (Han et al., 2014). A livello di organi linfoidi invece le lesioni isto-patologiche sono caratterizzate da un collasso dei follicoli linfoidi con deplezione del centro germinativo, riduzione della



conta linfocitaria e si possono notare abbondanti infiltrati mononucleati a formare manicotti perivascolari (Hu et al., 2013). Riguardo la riduzione della risposta immunitaria indotta dai virus HP, un altro importante fattore da sottolineare è l'induzione di atrofia timica nei suinetti che porta a una riduzione dei linfociti T circolanti e di conseguenza, ad un'alterata risposta immunitaria adattativa, che risulta carente in quanto non avviene in maniera efficiente il necessario cross-talk tra risposta innata e risposta adattativa (Amarilla et al., 2016).

## **IMMUNITA'**

L'immunità protettiva nei confronti del virus della PRRS si sviluppa più lentamente, circa in un paio di mesi, rispetto a quanto si realizza in corso di altre infezioni. La suscettibilità all'infezione decresce con l'età, così che le scrofe appaiono meno suscettibili agli effetti del virus rispetto ai giovani animali, anche se, nei soggetti adulti la durata della protezione sembra essere minore (Martelli, 2013).

Lo sviluppo della risposta adattativa verso PRRSV è inusuale sia per la componente umorale che cellulo-mediata. Gli anticorpi circolanti sono misurabili già dopo 5-7 giorni dall'infezione e la maggior parte degli animali sieroconverte entro il 14° giorno. La rapida risposta immunoglobulinica non corrisponde però ad una risposta neutralizzante il virus: infatti, è proprio in questo periodo che si registra il picco della viremia cui si associa l'acme delle manifestazioni cliniche e delle lesioni. Tali anticorpi, misurati mediante il test ELISA, sono diretti verso la nucleoproteina, le glicoproteine M ed E, e le proteine non strutturali (NPS2) e non manifestano alcuna funzione protettiva. Si ritiene che il precoce sviluppo di anticorpi non-neutralizzanti giochi un ruolo nello sviluppo della sindrome, per effetto di un fenomeno denominato antibody-dependent enhancement (ADE) in base al quale la presenza di anticorpi faciliterebbe la replicazione virale a livello alveolare. Questi anticorpi non protettivi agirebbero come un "cavallo di Troia", proteggendo il virus e favorendo l'internalizzazione delle particelle virali da parte dei macrofagi.

Gli anticorpi neutralizzanti (NA) non vengono rinvenuti prima della quarta-quinta settimana post-infezione e sono principalmente diretti verso GP5, GP4 e M. Essi svolgono un ruolo importante nel caso dell'infezione naturale, anche se la risoluzione



della viremia dipende dalla perdita della suscettibilità al virus da parte dei macrofagi più che da un loro ruolo. Ciò trova conferma nel fatto che, in fase post-viremica, l'infezione viene confinata al tessuto linfatico, ricco in macrofagi. Gli anticorpi neutralizzanti, quando presenti prima della comparsa dell'infezione, hanno la piena capacità di contrastare l'infezione, proteggendo l'animale dalle turbe riproduttive, dal passaggio transplacentare del virus e dallo sviluppo di viremia nei giovani animali oltre che operando una *clearance* dell'infezione in atto. Purtroppo però, questi effetti si sono osservati solo in condizioni sperimentali dopo immunizzazione passiva di animali recettivi con siero immune, come conseguenza del raggiungimento di elevati titoli sierici di anticorpi neutralizzanti. Al giorno d'oggi, nessuna somministrazione di vaccino, sia attenuato che inattivato, è in grado di evocare una risposta siero-neutralizzante di entità tale da prevenire l'infezione e la malattia associata.

La risposta cellulo-mediata è caratterizzata da un'intensa risposta linfoproliferativa che compare in quarta settimana post-infezione (21-28 giorni post-infezione), contestuale o di poco precedente alla risposta siero-neutralizzante. Tale risposta si associa alla produzione di IFN- $\gamma$  e di IL-2. Le cellule secernenti IFN- $\gamma$ , misurate mediante la tecnica ELISpot, sono principalmente CD4+CD8+ oltre a proporzioni più piccole di CD4-/CD8alpha beta+ T citotossici. Recentemente, è stato evidenziato che, a seguito di infezione in soggetti immunizzati con vaccini attenuati, si ha una più rapida e qualitativamente elevata risposta in un numero maggiore di animali, definiti responder.

La risposta innata dell'ospite riveste un ruolo importante nei confronti dell'infezione virale; costituisce la prima risposta di difesa attiva e induce la stimolazione della risposta adattiva. Il virus della PRRS è in grado di bloccare la sintesi degli IFN di I tipo (Miller et al., 2004), infatti in corso di infezione è in grado di inibire la risposta di IFN- $\alpha$  riducendo i suoi livelli nel polmone, sede di replicazione primaria del virus. Gli isolati diversi dello stesso sottotipo o genotipo hanno una differente capacità di indurre o inibire una risposta IFN- $\alpha$ , l'espressione/secrezione di TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12. Infatti, IL-10, citochina ad attività antiinfiammatoria/immunoregolatrice con prevalente azione di "spegnimento", è aumentata in corso d'infezione da PRRSV e i suoi livelli sembrano dipendere dall'isolato responsabile dell'infezione. Una maggiore potenzialità di



induzione di IL-10 sosterebbe una inibizione della produzione di cellule secernenti IFN-gamma. Ricerche più recenti hanno mostrato che altri fattori di immunoregolazione, come ad esempio FoxP3, possa indurre la compromissione della risposta immunitaria in senso depressivo (Ferrarini et al, 2015). Pertanto l'inibizione dell'efficienza della risposta innata sarebbe mediata sia dall'alterata presentazione antigenica da parte delle cellule preposte (riduzione dell'espressione di MCHC-I, MCHC-II e di CD14) sia a seguito della modificazione del pattern citochinico il cui equilibrio, indispensabile per una corretta risposta, risulta anomalo per effetto di una riduzione delle citochine pro-infiammatorie a vantaggio di quelle ad attività di "spegnimento-inibizione" (Borghetti et al., 2011).

## **PREVENZIONE E CONTROLLO**

Gli obiettivi per la prevenzione ed il controllo della PRRS sono principalmente due: impedire l'entrata del virus in un allevamento indenne, o di virus diversi rispetto a quello residente in un allevamento infetto; favorire l'acquisizione di una solida immunità di popolazione verso il virus residente. La presenza di isolati diversi nella stessa realtà produttiva è il principale fattore che limita il controllo della sindrome, poiché l'immunità crociata non è completa e pertanto l'infezione con un isolato diverso dai precedenti determina la "riaccensione dei problemi clinici".

Al fine di impedire l'entrata di un "nuovo virus", in maniera tale che l'intera popolazione possa acquisire l'immunità protettiva verso quello residente, è necessario adottare stringenti misure di biosicurezza (Martelli, 2013). Esse prevedono innanzitutto l'acclimatamento e il monitoraggio per gli animali di rimonta prima dell'inserimento nell'allevamento mediante l'impiego di un periodo di quarantena in locali d'isolamento idonei ubicati al di fuori dell'unità produttiva, oltre che l'adozione delle misure elementari, quali il controllo dei mezzi di trasporto, del personale di allevamento, l'attuazione di programmi di disinfestazioni nei confronti degli insetti.

L'introduzione di scrofette di rimonta negative (provenienti da allevamento indenne) per PRRSV, opportunamente acclimate, è fondamentale non solo al fine di evitare l'introduzione di un nuovo virus in allevamento, ma anche di non favorire la circolazione di quello residente, avendo sviluppato una solida immunità, in tempo utile



rispetto al momento dell'introduzione. La fase di acclimatamento delle rimonte, si basa su tre momenti essenziali: contatto con il virus residente, sviluppo di immunità e fase di "raffreddamento" dell'infezione contratta, ossia periodo sufficientemente lungo che favorisce non solo lo sviluppo della risposta immunitaria specifica ma che evita anche la diffusione virale. È bene ricordare che un altro momento di rischio per l'introduzione del virus in allevamento è rappresentato dall'impiego del seme per l'IA. La corretta gestione delle scrofette di rimonta costituisce il primo momento per perseguire la stabilizzazione dell'allevamento, condizione essenziale per un efficace controllo e che può preludere al processo di eliminazione del virus della PRRS. Un allevamento di riproduttori con infezione enzootica da PRRS viene definito stabile (positivo-stabile) nel momento in cui vi sono evidenze virologiche che dimostrano la mancata trasmissione scrofa – suinetto sia verticale che orizzontale durante il periodo di lattazione (Martelli, 2013). La stabilizzazione dell'allevamento viene acquisita con l'applicazione di misure gestionali che, se non interviene l'introduzione di nuovo virus, determinano lo sviluppo di una immunità di popolazione solida e omogenea nei confronti di quello residente, con assenza quindi di sottopopolazioni recettive e conseguente scomparsa degli effetti del virus. L'impiego della vaccinazione è un metodo che consente la stabilizzazione in allevamento ed ha l'obiettivo di stimolare una risposta immunitaria protettiva nei confronti delle manifestazioni cliniche della malattia. Anche se la protezione conferita dalla immunizzazione non è completa per la diversità genomica tra isolato e virus vaccinale (Mengeling et al., 2003), essa contribuisce a limitare i danni clinici e produttivi dell'infezione nei giovani animali che subiscono una forte pressione infettante data dalla circolazione virale nei reparti di svezzamento. I due principali tipi di vaccini disponibili sono: vaccini vivi attenuati o MLV per animali all'ingrasso e spenti/inattivati o KV per animali riproduttori. Vengono somministrati nei suinetti dalle 6 settimane di vita, mentre nei riproduttori 2 settimane prima della copertura. Inoltre, sono stati recentemente sviluppati e ottimizzati nuovi metodi e dispositivi e per facilitare la vaccinazione e aumentare l'efficacia del vaccino. Applicazioni innovative, come vaccini spray e gene-gun o determinanti virali (ad esempio DNA, DNA ricombinante, peptidi) integrati con immunomodulatori o citochine, sembrano essere strumenti promettenti e vantaggiosi per eseguire una



somministrazione più veloce, indolore e sicura, nonché per indurre una stimolazione più efficace delle funzioni immunitarie (Meier et al., 2004). Negli ultimi anni sono stati allestiti vaccini vivi attenuati nei confronti di HP-PRRSV che hanno mostrato sia una protezione omologa e sia un certo grado di protezione eterologa (Wei et al., 2013). Sono poi stati prodotti un vaccino contenente un ceppo attenuato derivante dall'isolato HP-PRRSV-QY1, con una delezione di 32 aminoacidi nella proteina NSP2 (Liu et al., 2015) e un altro vaccino contenente il virus HP-PRRSV-HB-XL, con caratteristiche di bassa morbilità e bassa mortalità nei maiali (Zuo et al., 2015). La programmazione dell'impiego del vaccino deve essere fatta con cura e attenzione in quanto in Cina sono stati riportati due casi di ricombinazione naturale tra il virus vaccinale e un HP-PRRSV circolante (Li et al., 2007) ed eventi di riacquisizione di virulenza in campo di ceppi vaccinali attenuati (Zhao et al., 2017).

L'eliminazione del virus della PRRS dagli allevamenti appare una delle soluzioni possibili per controllare l'infezione, a differenza della eradicazione spontanea dell'infezione da territori più o meno estesi che appare di difficile attuazione per via delle condizioni attuali della suinicoltura intensiva. L'immunità è efficiente nell'eliminare lo stato di portatore persistente e, col tempo, l'intera popolazione sviluppa un'immunità sterilizzante. Il virus non persiste in una popolazione immune, pertanto, se non vi è contatto con virus eterologo, l'infezione tende a scomparire nel singolo animale, dapprima, e nella popolazione, in seguito.

Diversi protocolli di eliminazione sono stati proposti negli ultimi anni, ma il successo dell'uno o dell'altro viene decretato da diversi fattori, quali la consistenza numerica dell'allevamento, la valutazione preliminare del costo/beneficio e la valutazione delle probabilità che lo status di indennità acquisito venga mantenuto nel tempo, per cui la pianificazione di misure da adottare al fine di ottenere l'eliminazione del virus deve necessariamente tener conto delle singole realtà produttive.



## PARTE SPERIMENTALE

### ***OBIETTIVO***

Nel 2014, un virus italiano PRRS-1 (PRRS-1 40/2014) è stato isolato nel nostro laboratorio da un focolaio di PRRS che si è manifestato nella fase di svezzamento, contraddistinto da una grave malattia respiratoria e sistemica (anoressia, febbre persistente), le cui caratteristiche di lunga durata e di mortalità superiore al 50% gli hanno conferito la definizione di focolaio “atipico” della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (Canelli et al., 2017).

Il presente studio ha lo scopo di valutare, in condizioni sperimentali dopo Challenge in suini suscettibili, quattro differenti aspetti:

*a)* riprodurre in vivo la malattia associata all’infezione del primo isolato italiano di PRRSV ad alta patogenicità (PRRSV-1 40/2014) per confermare la patogenicità e le caratteristiche cliniche;

*b)* confrontare le dinamiche dell’infezione di tale virus con un isolato “convenzionale” a normale patogenicità (PRRS-1 11/2014), e con un controllo negativo;

*c)* verificare se le differenze in virulenza/patogenicità dei due isolati sono associate a differenti pattern virologici, sierologici, patologici e immunologici;

*d)* valutare l’efficacia di un vaccino commerciale PRRSV-1 MLV nei confronti di PRRSV-1 PR40/2014.



## **SPERIMENTAZIONE 1**

### **MATERIALI E METODI**

#### **Virus**

PRRSV-1 PR40/2014, successivamente denominato PR40, è stato isolato in un allevamento (sito 2) della Pianura Padana da polmoni di soggetti post-svezzamento che presentavano un quadro clinico con febbre elevata, sintomatologia clinica e respiratoria gravi. Il focolaio di PRRS ha avuto un decorso di circa 6 mesi, con una elevata percentuale di mortalità (fino al 50%) nella fase di post-svezzamento.

Il virus “convenzionale” PRRSV-1 PR11/2014, successivamente denominato PR11, è stato isolato da polmoni di animali in fase di accrescimento che manifestavano malattia respiratoria associata ad infezione da PRRS. L’andamento del focolaio, in termini di morbilità e mortalità, era compatibile con un normale episodio della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino.

In entrambi i casi, PRRSV è stato dimostrato primariamente mediante tecnica RT-PCR (Martelli et al., 2013), e successivamente è stato isolato su macrofagi alveolari di suino. Gli isolati virali sono stati confermati mediante una tecnica di colorazione specifica-PRRSV su cellule e dopo mediante RT-PCR (Martelli et al., 2013), e tutti i campioni sono risultati negativi per altri agenti virali (PCV2, SIV, ADV).

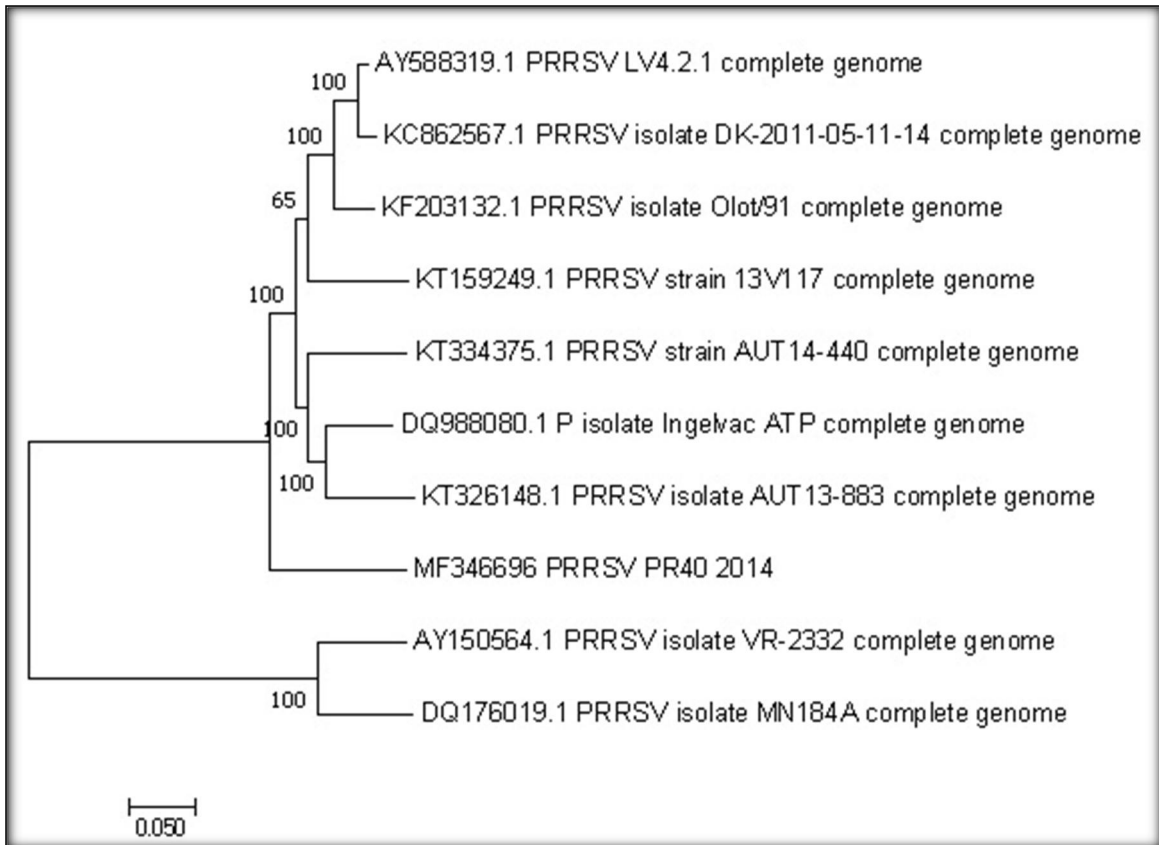
L’intero genoma dei due isolati è stato sottoposto ad analisi di sequenziamento: l’RNA totale è stato estratto e convertito in un singolo filamento di cDNA; successivamente il doppio filamento di cDNA è stato simultaneamente sintetizzato e amplificato con random primer attraverso il metodo shotgun di amplificazione dell’intero genoma. La DNA library è stata costruita dall’amplificato del ds cDNA e sottoposta a massive parallel sequencing sulla piattaforma Illumina MiSeq System con un modulo di 2x300bp, seguendo le istruzioni del produttore. Le reads (piccole sequenze di DNA) ottenute sono state inizialmente tagliate con filtro di qualità e mappate sul genoma di riferimento. Le reads mappate sono state riunite in una sequenza consenso (consensus coting) per il genoma virale completo. Gli eventuali eventi di ricombinazione sono stati valutati mediante il software SimPlot, versione 3.5.1. Tutti gli isolati PRRS-1 con sequenze dell’intero genoma depositate in GeneBank sono state utilizzate per



costruire i data set. Le analisi genetiche sono state fatte utilizzando MEGA7. L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il metodo Neighbor-Joining. Le distanze genetiche sono calcolate usando il modello parametro Kimura 2, con 1000 repliche di bootstrap.

Il genoma di PRRS -1 PR40/2014 è risultato di 14,678 bp (GenBank accession number MF346695): l'analisi filogenetica ha mostrato che PR40 è un PRRSV-1 subtype 1 (PRRSV1.1 PR40/2014). La sequenza nucleotidica dell'ORF 5 ha mostrato una similarità dell'85,9% con il virus Lelystad (LV). Per la filogenesi di entrambe le ORF 5 e 7, PR 40 è risultato raggruppato nel cluster degli isolati Italiani, definito come sottotipo 1. Nella regione NSP2 sono state identificate due delezioni discontinue, rispettivamente di 42 nt (14 aa) e di 366nt (121 aa), in particolare alla posizione 693-814 e 1061-1074 del genoma di PRRSV (le posizioni sono relative al genoma del virus Lelystad), aa 310-431 e 678-691 della regione NSP2. La seconda delezione è localizzata in una regione della NSP2, adatta a tollerare delezioni di diverse basi da 100 a 200 aa, senza influenzare la vitalità virale e la sua replicazione (Han et al., 2007). Una delezione di nt 6 (2aa) è stata osservata anche nell'ORF 4 (244-245 aa del genoma di PRRSV). Le delezioni discontinue del gene NSP2 non sono dovute a nessun evento ricombinante. Dall'analisi filogenetica dell'intero genoma virale, PR40 risulta in un differente lineaggio, e in particolare, in un diverso ramo del cluster composto da isolati Sud Coreani, Danesi e Austriaci (fig. 1) (Canelli et al., 2017). Per l'isolato PRRSV-1 PR11/2014 è stata ottenuta una sequenza parziale dell'intero genoma, ma è stato comunque confermato come PRRSV-1.1, con una similarità con il virus Lelystad del 90,4 % per la ORF5.





**Figura 1:** Albero filogenetico delle sequenze nucleotidiche simili di PRRSV.1 e dell'isolato PR40. L'albero è stato costruito utilizzando l'algoritmo Neighbor-joining. Il numero ad ogni ramo rappresenta valori bootstrap.



## Studio sperimentale

Nello studio sperimentale, condotto in uno stabulario con livello di biosicurezza 2 (BLS2), sono stati arruolati 17 suini convenzionali di 6 settimane di età, provenienti da un allevamento indenne da PRRS e negativi per i principali patogeni come SIV, PRRSV e Porcine circovirus-2 (PCV2). Gli animali nel periodo di acclimatamento (6 giorni prima dell'infezione) sono stati suddivisi casualmente in tre gruppi e collocati in stanze separate, come di seguito riportato:

- i. Gruppo PR40 (PR40): 7 suinetti inoculati con una dose di  $10^5$  TCID<sub>50</sub> in 2ml (1ml per narice) per via intra-nasale (IN) con PRRSV1\_PR40/2014 a T=0 (giorno di inoculazione);
- ii. Gruppo PR11 (PR11): 7 suinetti inoculati con una dose di  $10^5$  TCID<sub>50</sub> in 2ml (1ml per narice) IN with PRRSV1\_PR11/2014 a T=0;
- iii. Control (C): 3 suinetti ai quali è stato somministrato solo medium (MOCK/controllo negativo).

I campioni di sangue per esame sierologico e per isolamento di PBMC sono stati prelevati il giorno dell'inclusione (-6 post inoculazione/dpi) e ai giorni T 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28 e 35 post inoculazione. I sieri sono stati separati in due differenti criotubi, uno conservato a -70° C per la ricerca del virus e l'altro conservato a -20° C per la valutazione degli Anticorpi specifici PRRS.

Il peso corporeo individuale di tutti i soggetti è stato registrato a 0, 21 e 35 giorni post inoculazione.

I soggetti che presentavano grave sintomatologia o una prognosi infausta sono stati sottoposti ad eutanasia secondo i protocolli standard per la specie in accordo con la normativa per il benessere animale.

Gli animali sopravvissuti sono stati sottoposti ad eutanasia al giorno 35 post inoculazione, successivamente sono state eseguite le necroscopie per l'esame delle lesioni anatomopatologiche e la raccolta di campioni dagli organi interessati.

I campioni degli organi sono stati raccolti e stoccati a -70°C e/o fissati in formalina.



## Valutazioni cliniche

Quotidianamente dal giorno 0 al giorno 35 dpi è stata misurata la temperatura rettale ( $\geq 40^{\circ}\text{C}$ =febbre) e sono stati valutati i seguenti parametri clinici a ciascuno dei quali è stato assegnato uno score:

- a) appetito con valori da 0-normale, 1-diminuito, 2-assente; stato del sensorio: 0-normale, 1-compromesso/depresso, 2-agonico;
- b) sintomatologia respiratoria assegnando un punteggio 0 = normale, 1 = lieve dispnea e/o tachipnea quando stressati, 2 = lieve tachipnea e/o tachipnea a riposo, 3 = moderata dispnea e/o tachipnea quando stressati, 4 = moderata dispnea e/o tachipnea a riposo, 5 = grave dispnea e/o tachipnea quando stressati, 6 = grave dispnea e/o tachipnea a riposo (Karniychuk et al., 2010). I punteggi venivano attribuiti prima e dopo una situazione di stress indotta trattenendo l'animale per 45 secondi.

Il veterinario che si è occupato del monitoraggio clinico non era a conoscenza del gruppo che stava valutando.

## Valutazioni anatomo-patologiche

L'esame necroscopico è stato eseguito sia in caso di morte naturale dei suini sia dopo eutanasia.

### Esame macroscopico

La presenza e la gravità delle lesioni macroscopiche polmonari è stata valutata e registrata con un punteggio da 1 a 4, che corrisponde alla percentuale di volume dell'intero polmone e dei singoli lobi colpiti dalle lesioni tipiche (Halbur et al., 1995).

Campioni da polmoni, linfonodi bronchiali e timo sono stati prelevati da ogni animale per le analisi virologiche, istologiche e immuno-istochimiche.

Per l'esame batteriologico sono stati analizzati campioni di cuore, milza, fegato, intestino e polmoni.

L'esame delle lesioni macroscopiche è stata eseguito da un patologo che non era a conoscenza del gruppo che stava valutando.



### Esame istologico

Per l'esame istologico i tessuti (polmone, linfonodi tracheo-bronchiali e timo) sono stati disidratati in alcol e inclusi in paraffina, le micro-sezioni sono state colorate con Ematossilina ed Eosina (EE) e lette usando un sistema semi-quantitativo di attribuzione di punteggio (Weesendorp et al., 2014).

Ai campioni istologici dei polmoni è stato assegnato un punteggio da 0 a 4 sulla base del grado di polmonite interstiziale presentata (presenza di polmonite interstiziale o atelettasia focale o diffusa, entità dell'infiltrato nei setti alveolari e negli infiltrati perivascolari): 0 = no lesioni, 1 = lieve, 2 = moderato, 3 = moderato/diffuso, 4 = grave (Weesendorp et al. 2014).

Agli organi linfoidi (timo e linfonodi bronchiali) è stato attribuito un punteggio sulla base del grado della linfocitopenia presentata: 0 = no lesioni, 1 = lieve, 2 = moderato, 3 = moderato/diffuso, 4 = grave.

### Immunoistochimica

L'immunoistochimica è stata eseguita su sezioni di timo e linfonodi tracheo-bronchiali per differenziare le cellule linfocitarie T e B utilizzando, rispettivamente, anticorpi primari anti-CD3 (Rat anti-human CD3 clone CD3-12, AbD Serotec) e anti-CD79 $\alpha$  (Mouse anti-human CD79 $\alpha$  clone HM57, AbD Serotec)(tabella 1). Per amplificare il segnale è stata utilizzata la tecnica Avidina Biotina Complex (kit Vectastain Elite ABC di Vector Laboratories): la reazione è stata sviluppata trattando le sezioni con la DAB (Dako cytomatic Liquid DAB+ Substrate Chromogen System) e poi contro-colorate con soluzione di ematossilina di Mayer. Le cellule positive CD3 e CD79 $\alpha$  sono state contate al microscopio ottico valutando 5 campi per sezione con un ingrandimento 20X, come da protocollo leggermente modificato di Weesendorp et al., 2014. Per valutare la linfocitopenia negli organi linfoidi è stato adoperato il seguente score: : 0 = normale, 1 = media linfocitopenia , 2 = moderata linfocitopenia, 3 = diffusa linfocitopenia e 4 = grave deplezione linfocitaria.



Sottopopolazione Linfocitaria	Anticorpo primario	Diluizione anticorpo in PBS	Tempo di incubazione	Temperatura d'incubazione
CD3	Rat-anti- human	1:100	1 ora	22°C ±2
CD79α	Mouse-anti- human	1:30	1 ora	22°C ±2

**Tabella 1:** anticorpi utilizzati per l'analisi immunoistochimica

### Valutazioni virologiche

Il siero è stato processato per l'estrazione di RNA utilizzando il Trizol LS (Invitrogen), secondo le istruzioni del produttore: RNA virale è stato successivamente amplificato e analizzato mediante una real time RT-PCR quantitativa (qtRT-PCR), come precedentemente descritto (Martelli et al., 2013). I virus utilizzati per l'infezione sono stati re-isolati dai sieri di soggetti infetti che avevano il più alto numero di copie in qtRT-PCR, sia su colture primarie di macrofagi alveolari di suino (MAS) sia su colture continue adattate MARC-145. I virus re-isolati su MARC 145 adattate sono stati sequenziati per ORF 7 per confermare l'omologia con gli isolati originali dell'infezione, e successivamente titolati e utilizzati come antigene per il test di Sieroneutralizzazione (SN).

### Valutazioni immunologiche

Gli anticorpi totali sono stati valutati utilizzando il kit PRRSV-Abs ELISA (HerdChek PRRSV X3, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA), secondo le istruzioni del produttore: i campioni sono stati considerati positivi con una ratio sample-to-positive (S/P)  $\geq 0,4$ .

Il test di virus-neutralizzazione (VN) nei confronti degli isolati PRRS omologhi (PR40 e PR11) è stato eseguito secondo la metodica descritta da Kim et al., 2011: il titolo degli anticorpi virus-neutralizzanti sono calcolati come il reciproco della diluizione più alta che inibisce l'effetto citopatico nel 100% del pozzetto. I campioni sono considerati positivi se il titolo è maggiore di 2.0 ( $\log_2$ ) (Zuckermann et al., 2007).



## Analisi statistica

Per l'analisi statistica, per tener conto della non-indipendenza delle osservazioni ripetute fatte sugli stessi soggetti, sono stati applicati i seguenti modelli: modelli lineari a effetti misti (Mixed Effects Linear models-LMEm, dove il tempo è stato considerato una variabile categorica) e modelli generalizzati additivi a effetti misti (Mixed Effects Generalized Additive models-GAMm, dove il tempo è stato trattato come una variabile continua). Sono stati considerati l'effetto tempo (giorno dell'osservazione), del trattamento (cioè la differenza stimata tra i gruppi per la viremia o per i livelli di anticorpi) e la loro interazione (cioè la diversa forma della risposta), come in un esperimento split-plot. Il gruppo di controllo è stato escluso dai modelli di regressione, in quanto si è ipotizzato che una differenza di risposta (numero copie cDNA o valore S/P) tra i soggetti trattati (vaccinazione /inoculazione) e non trattati esistesse già in accordo con il protocollo sperimentale, mentre l'attenzione è stata focalizzata sulla differenza tra i gruppi sottoposti a trattamento. I valori di  $p$  riportati sono derivati dai modelli LME, dove è stata imposta ai residui una struttura di correlazione autoregressiva. I valori dei campioni negativi in qtRT-PCR, ELISA e VN sono stati definiti rispettivamente come numero minimo rilevabile di copie di cDNA, valore S/P e titolo virale. Il numero di copie di cDNA e il titolo di VN sono stati trasformati in valori logaritmici prima delle analisi per soddisfare le ipotesi di distribuzione necessarie per i modelli di regressione. Per l'analisi dell'incremento del peso corporeo è stata applicata una correzione per la differente dispersione (eteroschedasticità) all'interno del parametro tempo, in quanto la varianza residuale aumenta con il peso stesso. Il punteggio di lesione polmonare e il punteggio istologico sono stati analizzati mediante il test del Chi-quadro e il test esatto di Fisher. Il software R (R Core Team, 2017) è stato utilizzato per analizzare i dati e ottenere i grafici, utilizzando "nlme" (Pinheiro e Bates, 2000) e "ggplot2" (Wickham, 2009).



## RISULTATI

### Valutazioni cliniche

Nei gruppi PR40 e PR11 di animali infettati sperimentalmente la mortalità è risultata simile; quattro maiali per gruppo sono stati sottoposti ad eutanasia durante la sperimentazione a causa delle condizioni vitali gravemente compromesse:

- I. gruppo PR40: al 10°, 14°, 21° e 28° giorno post infezione (p.i.);
- II. gruppo PR11: al 14° (2 maiali), 17° e al 25° giorno p.i.)

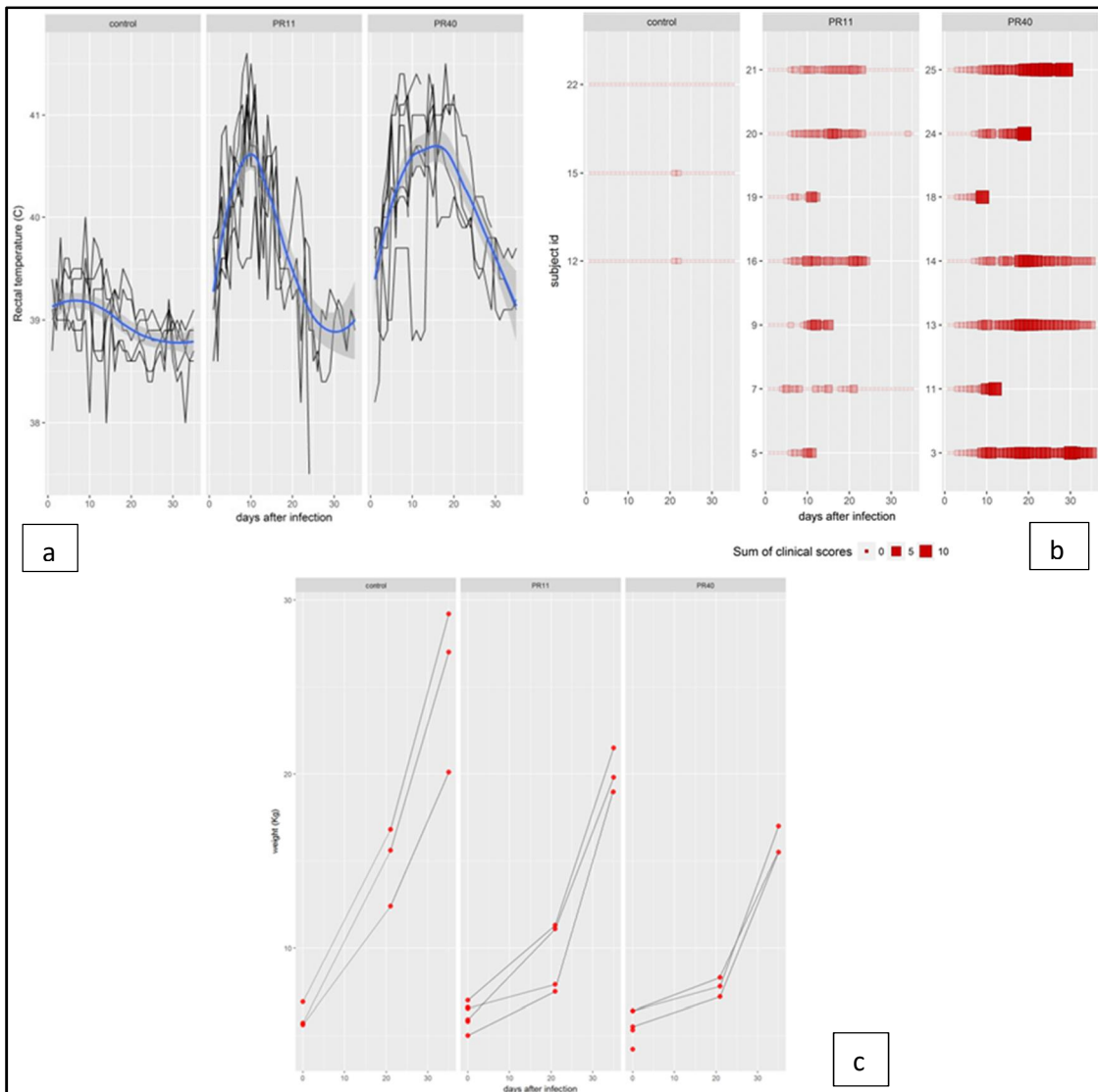
Nel gruppo di maiali infettati con PR40 la temperatura rettale ha raggiunto valori superiori a 41°C in tutti gli animali, e in media, era sopra i 40°C dal giorno 5 al giorno 24 p.i. (fig. 2a); nel gruppo PR11 i maiali hanno avuto febbre dal giorno 7 al giorno 15 p.i. La temperatura rettale degli animali del gruppo di controllo è risultata costantemente all'interno del range di normalità (Canelli et al., 2017).

Dopo il 3° giorno p.i. nel gruppo di animali PR40 e dopo il 5° nel gruppo PR11 i maiali hanno iniziato a mostrare una lieve e/o moderata sintomatologia respiratoria e letargia (fig. 2b). I segni clinici nel gruppo PR40 sono peggiorati dal giorno 7 p.i. In particolare i maiali mostravano una grave sintomatologia respiratoria associata a dispnea, anoressia e letargia. Questo quadro clinico è stato presente fino alla fine dell'esperimento. Durante la seconda settimana p.i., due degli animali appartenenti al gruppo PR40, sottoposti ad eutanasia, presentavano cianosi dei padiglioni auricolari, del naso e a livello di addome. Il gruppo controllo negativo non ha mostrato alcuna sintomatologia respiratoria in nessun momento per tutta la durata dello studio (Canelli et al., 2017).

Il valore di ADWG (Average Daily Weight Gain) è stato calcolato dai pesi individuali dei soggetti (gr/suino/giorno). Durante tutto il periodo della sperimentazione (0-35 dpi), il valore di ADWG del gruppo PR40 è risultato più basso ( $p < 0.05$ ) (fig 2c): in particolare nel periodo da 0 a 21 dpi, l'aumento di peso dei suini infettati con PR40 è stato di 155 gr/d, valore molto più basso rispetto al gruppo infettato con PR11 (256gr/d) e al gruppo di controllo (422gr/d). Durante l'ultimo periodo della sperimentazione (21-35 dpi), i tre gruppi hanno mostrato un valore di ADWG simile, probabilmente perché la



maggior parte dei suini che versava in condizioni critiche sono morti a 21 dpi e sono sopravvissuti i suini che hanno superato la malattia.



**Figura 2:**

**2a.** Temperatura rettale dei suini da 0 a 35 dpi (verde =C; viola= PR11; rosso=PR40). Temperatura  $\geq 40^{\circ}\text{C}$  è considerata febbre. La linea centrale rappresenta la media di ogni gruppo.

**2b.** Score clinici di ciascun maiale per gruppo (C, PR11, PR40).

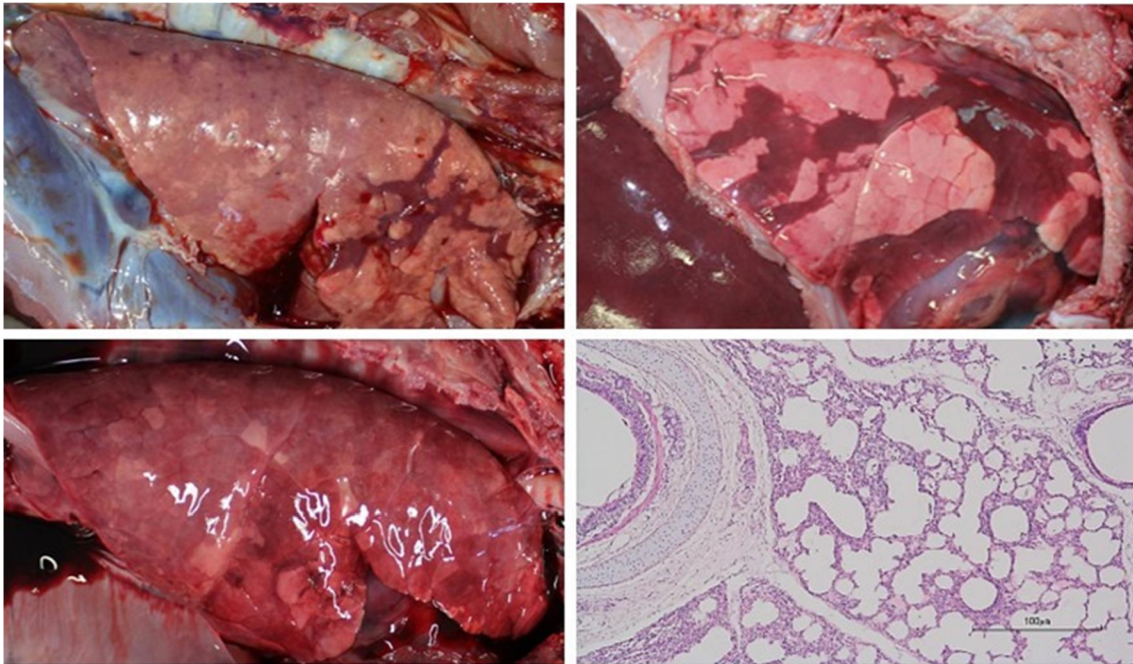
**2c.** Average daily weight gain calcolato per ciascun gruppo per i primi 21 dpi, tra 21-35 dpi e per tutta la durata dello studio (Canelli et al., 2017).



## Valutazioni anatomo-patologiche

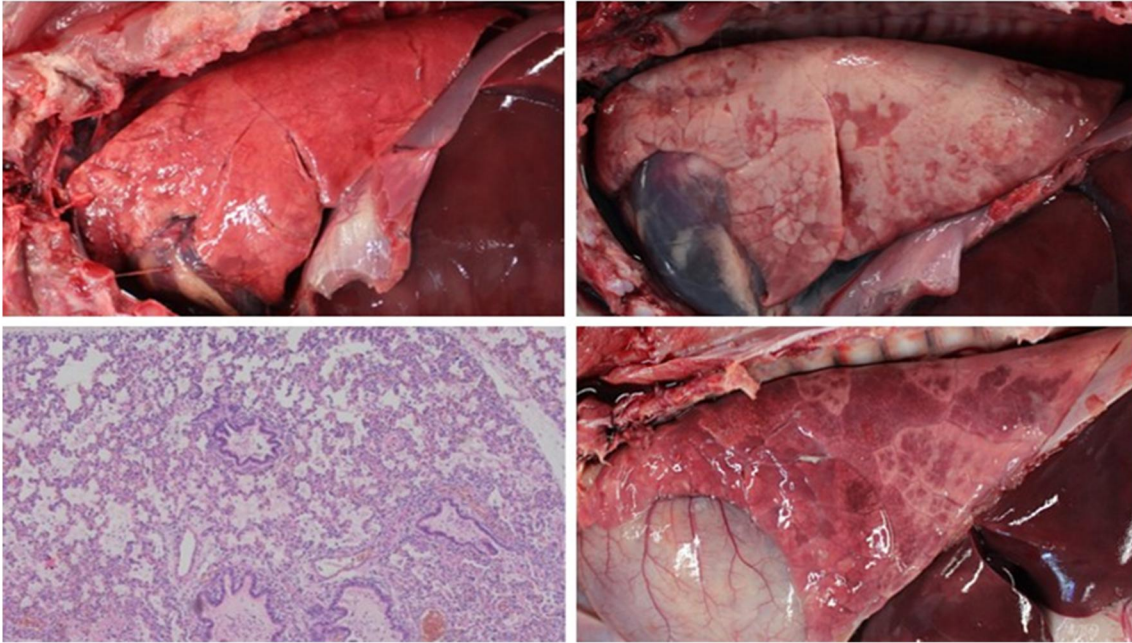
### Esame macroscopico

L'esame macroscopico dei polmoni dei maiali del gruppo di controllo negativo non ha evidenziato alcuna lesione. Invece negli altri due gruppi, indipendentemente dal ceppo virale usato per l'infezione, i polmoni presentavano lesioni riconducibili a polmonite interstiziale con un aumento della consistenza al tatto del parenchima polmonare e con aspetto edematoso talvolta congesto (figg. 3a e 3b). In alcuni casi sono state osservate lesioni riferibili a infezioni batteriche secondarie. Nel gruppo PR40, le lesioni macroscopiche maggiormente esaminate avevano una distribuzione a carattere diffuso, quali edema polmonare, congestione e consolidamento, con screziature e aree multifocali di aspetto più scuro. In questo gruppo la media del punteggio attribuito alle lesioni macroscopiche polmonari è risultato maggiore di 3. In entrambi i gruppi infettati è stato riscontrato un certo grado di ipoplasia timica: questa lesione è risultata essere molto più evidente negli animali del gruppo PR40. Inoltre, in 3 maiali su 7 è stata osservata un'atrofia quasi completa della porzione cervicale del timo. I linfonodi tracheobronchiali presi in esame erano congesti, di aspetto edematoso e aumentati di volume in entrambi i gruppi.



**Figura 3:** **3a** Lesioni macroscopiche polmonari e rispettiva immagine istologica del gruppo PR40.





**Figura 3: 3b** Lesioni macroscopiche polmonari e rispettiva immagine istologica del gruppo PR11.

### Esame istologico

Le analisi isto-patologiche comparative delle varie micro-sezioni di polmone colorate con EE hanno evidenziato diversi gradi di gravità di polmonite interstiziale presente nei vari animali, caratterizzata da ispessimento dei setti alveolari, iperemia passiva, aree atelectasiche, una certa quantità di infiltrati linfocito-macrofagici negli spazi peribronchiolari e perivascolari, iperplasia dei pneumociti di tipo II (Tabella 2) in entrambi i gruppi. È interessante notare che una maggiore gravità delle lesioni è stata riscontrata negli animali del gruppo PR40 che presentavano inoltre una mancata attivazione del BALT. Nei polmoni dove era presente anche una infezione batterica secondaria è stata riscontrata la presenza di granulociti neutrofilici, linfociti e macrofagi nel parenchima e nel lume bronchiale materiale necrotico-purulento.

Le micro-sezioni di linfonodi tracheo-bronchiali hanno mostrato deplezione dei follicoli germinativi con maggiore presenza di corpi apoptotici a livello di centro germinativo e aumento della componente macrofagica (Tabella 3). Le micro-sezioni di timo erano caratterizzate da una diffusa riduzione della corticale e linfocitopenia della midollare, da notare che nel gruppo di PR40 la deplezione linfocitaria dei lobuli timici era particolarmente grave e in alcuni animali di questo gruppo si è vista una multifocale



scomparsa della linea di demarcazione cortico-midollare (Tabella 4). Queste lesioni sono state poi ulteriormente confermate in immunohistochimica (Tabelle 2-4). L'esame microscopico degli organi degli animali del controllo negativo non ha mostrato alcuna lesione evidente.

	C	PR11	PR40
<b>Soggetto 1</b>	0	2	4
<b>Soggetto 2</b>	0	1	4
<b>Soggetto 3</b>	0	2	3
<b>Soggetto 4</b>	/	3	3
<b>Soggetto 5</b>	/	3	3
<b>Soggetto 6</b>	/	2	4
<b>Soggetto 7</b>	/	2	3
Media± Sd	<b>0</b>	<b>2,14±0,60</b>	<b>3,42±0.46</b>

**Tabella 2:** Punteggio lesioni polmone: 0 = no lesioni, 1 = lieve, 2 = moderato, 3 = moderato/diffuso, 4 = grave (Weesendorp et al. 2014), divise per soggetto e per gruppo (Controllo (C), PR11 e Pr40,) Sd=deviazione standard

	C	PR11	PR40
<b>Soggetto 1</b>	0	2	4
<b>Soggetto 2</b>	0	2	4
<b>Soggetto 3</b>	0	3	3
<b>Soggetto 4</b>	/	2	3
<b>Soggetto 5</b>	/	3	4
<b>Soggetto 6</b>	/	3	3
<b>Soggetto 7</b>	/	2	4
Media± Sd	<b>0</b>	<b>2,42±0,46</b>	<b>3,57±0,46</b>

**Tabella 3:** Punteggio lesioni linfonodo: 0 = no lesioni, 1 = lieve, 2 = moderato, 3 = moderato/diffuso, 4 = grave (Weesendorp et al. 2014), divise per soggetto e per gruppo (Controllo (C), PR11 ePr40,) Sd=deviazione standard



	C	PR11	PR40
<b>Soggetto 1</b>	0	2	3
<b>Soggetto 2</b>	0	3	3
<b>Soggetto 3</b>	0	2	3
<b>Soggetto 4</b>	/	2	4
<b>Soggetto 5</b>	/	1	3
<b>Soggetto 6</b>	/	3	3
<b>Soggetto 7</b>	/	2	4
<b>Media ± Sd</b>	<b>0</b>	<b>2,14±0,60</b>	<b>3,28±0,42</b>

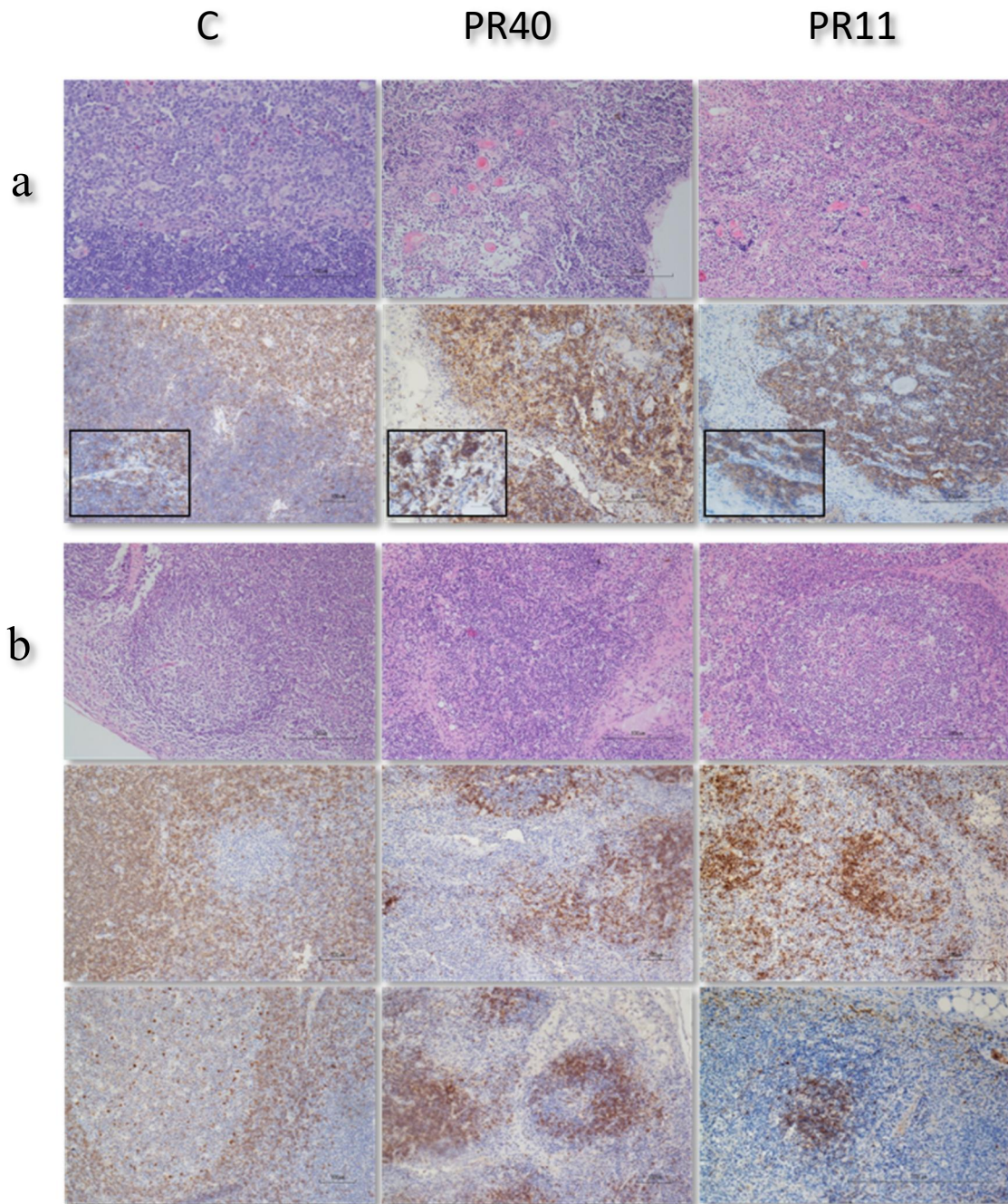
**Tabella 4:** Punteggio lesioni timo: 0 = no lesioni, 1 = lieve, 2 = moderato, 3 = moderato/diffuso, 4 = grave (Weesendorp et al. 2014) divise per soggetto e per gruppo (Controllo, PR11 ePr40,). Sd=deviazione standard

#### Immunoistochimica

L'esame immunoistochimico ha confermato le lesioni rilevate istologicamente, evidenziando i diversi tipi cellulari coinvolti nelle varie sedi anatomiche esaminate. Il timo degli animali di entrambi i gruppi mostrava una diminuzione di cellule CD3+ legata alla deplezione cellulare, in particolare la scarsa immuno-positività cellulare è apparsa ancora più marcata nel gruppo PR40 (fig.4a)

A livello linfonodale si è rilevato una marcata diminuzione delle cellule CD79α+ localizzate al centro dei follicoli che risultano poco o affatto attivati. Inoltre la diminuzione riguardava anche la popolazione di cellule CD3+ localizzate nell'area perifollicolare del follicolo germinativo. La zona T para-corticale è apparsa fortemente spopolata (4b). Nel polmone è risultata evidente una netta diminuzione della sottopopolazione linfocitaria CD3+ nei due gruppi, mentre la popolazione CD79α+ era totalmente assente.





**Figura 4:**

**4a** Istologia (sopra) e immunoistochimica (CD3, 10X) del timo nei gruppi C, PR40 e PR11;

**4b** Istologia (sopra) e immunoistochimica (CD3 10X, medio, CD79 10X, sotto) dei linfonodi bronchiali nei gruppi C, PR40 e PR11



### Esame batteriologico

*Streptococcus suis* è stato isolato da polmoni di animali sottoposti ad eutanasia nelle prime due settimane della sperimentazione, in entrambi i gruppi infettati. Soltanto in un singolo soggetto è stato isolato *Escherichia coli* da diversi organi. Nessun altro batterio è stato isolato.

### **Valutazioni virologiche**

Tutti gli animali arruolati nella sperimentazione erano negativi PRRS prima dell'infezione (0 dpi). Tre giorni pi, in entrambi i gruppi infettati le medie del RNA virale nel siero aumentano, raggiungendo il picco a 7 dpi nel gruppo PR40 e a 10dpi nel gruppo PR11. La viremia si è mostrata elevata per tutta la durata della sperimentazione nel gruppo PR40.

I sieri degli animali del gruppo di controllo, per tutto il periodo della sperimentazione, sono risultati negativi per la ricerca del PRRSV.

I virus PR40 e PR11 sono stati re-isolati dai sieri dei suini infetti durante la fase viremica (7 dpi per PR40 e 10 dpi per PR11) su MAS e poi successivamente adattati su MARC-145. L'analisi genetica dell'ORF5 e dell'ORF7 ha confermato l'identità tra i virus re-isolati e i virus inoculati a T 0.

### **Valutazioni immunologiche**

I sieri di tutti i soggetti della sperimentazione, sia il giorno dell'arruolamento che dell'inoculazione erano negativi ( $S/P < 0.4$ ) per anticorpi ELISA per PRRSV. Nel gruppo PR40, il 70% degli animali è risultato positivo per anticorpi PRRSV al 7° dpi a differenza dei suini del gruppo PR11 che erano negativi : al 10° dpi, tutti gli animali infettati erano positivi. Il gruppo di controllo è rimasto negativo per anticorpi PRRSV per tutto la durata dello studio.

Gli anticorpi virus-neutralizzanti sono stati evidenziati due settimane post-infezione nei soggetti infettati con PR40 ma il loro valore si è mantenuto a livelli più bassi rispetto al gruppo PR11, la cui risposta anticorpale virus-neutralizzante ha raggiunto il picco a 21 dpi.



## **SPERIMENTAZIONE 2**

### **MATERIALI E METODI**

#### **Virus e Vaccino**

La vaccinazione è stata eseguita mediante l'impiego di un vaccino commerciale vivo attenuato (MLV) in uso in Italia, allestito con il ceppo PRRSV Europeo DV (Porcilis® PRRS, MSD AH).

La dose utilizzata per la vaccinazione intramuscolo (IM) è stata di 2 ml/suino (contenente almeno  $10^4$  TCID<sub>50</sub> del virus PRRS DV).

L'isolato Italiano HP PRRSV1-PR40/2014 (GenBank accession number: MF346695) è stato utilizzato come virus per il challenge: il ceppo è stato isolato nel 2014 su tre passaggi di coltura primaria di macrofagi alveolari di suino (MAS) da polmoni di animali in accrescimento in un allevamento (sito 2) in cui si è verificato un grave focolaio di PRRS con un tasso di mortalità nella fase post-svezzamento superiore al 50% (Canelli et al., 2017). Le principali caratteristiche genetiche, cliniche, virologiche e patologiche sono argomento della sperimentazione 1, parte integrante della suddetta tesi.

#### **Studio sperimentale**

Lo studio sperimentale è stato condotto in uno stabulario con livello di biosicurezza 2 (BSL-2). Sedici suini convenzionali di 3 settimane di età, provenienti da un allevamento indenne da PRRS, dopo una fase di acclimatamento di 6 giorni, sono stati collocati in maniera casuale in stanze separate e assegnati ai seguenti gruppi:

- I. VAC-C: 2 animali sono stati vaccinati IM per PRRSV a 4 settimane di età (-35 giorni dall'inoculazione) e non infettati;
- II. VAC-PR40: 6 animali sono stati vaccinati IM per PRRSV (-35 giorni dall'inoculazione) e infettati per via intra-nasale (IN) con PRRSV1-PR40/2014 dopo 35 giorni post vaccinazione (dpv), cioè 0 giorni post inoculazione (dpi);
- III. PR40: 5 animali sono stati infettati IN con PRRSV1\_PR40/2014 dopo 35 dpv o 0 dpi;
- IV. C: 3 animali sono stati inoculati IN con il medium come controllo negativo.



Gli animali arruolati nello studio sono risultati negativi per SIV, PRRSV e Porcine circovirus-2 (PCV2). I gruppi VAC-PR40 e PR40 sono stati infettati per via IN con una dose di 2 ml/suino (1ml/narice) contenente circa  $10^5$  TCD<sub>50</sub> PRRSV. I campioni di sangue sono stati prelevati il giorno dell'inoculazione (0 dpi) e ai giorni 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 35 post inoculazione. Gli animali vaccinati (gruppi VAC-C e VAC-PR40) sono stati prelevati anche al momento della vaccinazione, 21 e 28 dpv. È stata eseguita l'eutanasia sia degli animali che durante la sperimentazione manifestavano gravi segni clinici con una prognosi mortale, sia, a fine sperimentazione, degli animali sopravvissuti, rispettando le norme sul benessere, secondo i protocolli standard. Successivamente sono state eseguite le necrosopie per l'esame delle lesioni anatomopatologiche e la raccolta di campioni dagli organi interessati.

## **Valutazioni cliniche**

Durante lo studio, sia nel periodo post-vaccinazione (-35 a 0 dpi) che post-challenge (0 a 35 dpi), tutti i soggetti sono stati sottoposti a valutazione clinica, osservando quotidianamente sintomi generali e respiratori e misurando la temperatura rettale ( $\geq 40^\circ\text{C}$ =febbre). A fine studio è stata valutata la percentuale di mortalità dei soggetti. I segni clinici per le condizioni generali sono stati valutati secondo il seguente score:

- Appetito: 0=normale, 1=diminuito, 2=assente;
- Stato del sensorio: 0=normale, 1=compromesso/depresso, 2=agonico,

mentre per i segni respiratori è stato adottato uno score (valori 0-6) in accordo con Karniychuk et al., 2010. Si è calcolata la somma dei differenti score per ottenere uno score clinico individuale per giorno (0-10). Il veterinario che si è occupato del monitoraggio clinico non era a conoscenza del gruppo che stava valutando.

## **Valutazioni anatomo-patologiche**

### Esame macroscopico

All'esame necroscopico è stato assegnato uno score alle lesioni macroscopiche osservate: il punteggio polmonare era il numero corrispondente alla percentuale del volume di tutto il polmone e del singolo lobo interessato da lesioni tipiche (Halbur et al., 1995). Da ogni animale sono stati prelevati campioni di tessuto cui sono stati



sottoposti ad analisi virologiche/batteriologiche e istologiche. L'esame delle lesioni macroscopiche è stata eseguito da un patologo che non era a conoscenza del gruppo che stava valutando.

### Esame istologico

Per l'esame istologico i tessuti (polmone, linfonodi tracheo-bronchiali e timo) sono stati disidratati in alcool e inclusi in paraffina: successivamente le sezioni sono state colorate con Ematossilina ed Eosina (EE). Ai campioni istologici dei polmoni è stato assegnato un punteggio da 0 a 4 sulla base del grado di polmonite interstiziale osservata (con presenza o assenza di complicazioni batteriche) come descritto precedentemente da Weesendorp et al. 2014 (0 = no lesioni, 1 = lievi, 2 = moderate, 3 = moderate/diffuse, 4 = gravi/diffuse, 5=gravi /ampiamente estese).

### **Valutazioni ematologiche**

Le analisi ematologiche sono state eseguite usando un analizzatore di ematologia automatica (CELL-DYN 3500 PLUS, Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA) su tutto il sangue.

### **Valutazioni virologiche**

RNA virale è stato valutato nel siero utilizzando un RT-PCR quantitativo (Martelli et al., 2013): RNA è stato estratto utilizzando Trizol LS (Invitrogen), seguendo le istruzioni del produttore.

### **Valutazioni immunologiche**

#### Sierologia

Tutti i sieri sono stati analizzati per la ricerca di Anticorpi totali per PRRSV utilizzando un kit ELISA (HerdChek PRRSV X3, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) secondo le istruzioni del produttore. I campioni che presentavano un rapporto S / P (sample/positive) maggiore o uguale a 0,4 sono stati considerati positivi per gli anticorpi totali PRRSV.



Il test di virus-neutralizzazione (VN) è stato eseguito su cellule MARC-145 utilizzando sia il ceppo PR40 che il ceppo DV (l'antigene contenuto nel vaccino), come da protocollo precedentemente descritto (Kim et al., 2011). Il titolo degli anticorpi virus neutralizzanti sono calcolati come il reciproco della diluizione più alta che inibisce l'effetto citopatico nel 100% del pozzetto. I campioni sono considerati positivi se il titolo è maggiore di 2.0 ( $\log_2$ ) (Zuckermann et al., 2007).

#### ELISpot IFN- $\gamma$

PBMC (Peripheral Blood mononuclear Cell) sono stati isolati dal siero come riportato da Ferrari et al., nel 2013. Un test ELISPOT (Enzyme-Linked immunoSpot) di IFN- $\gamma$  è stato utilizzato per quantificare le cellule secernenti IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  SC) specifiche PRRSV e per valutare dimensione e intensità degli spot in relazione alla produttività della cellula secernente-IFN- $\gamma$  come descritto in precedenza (Ferrari et Martelli et al., 2013). In particolare, i PBMC (in piastre a 96 pozzetti con una densità di  $4 \times 10^5$  cellule / pozzetto) sono stati stimolati con 1 MOI dei due virus (DV e PR40). Le piastre sono state analizzate utilizzando un lettore ELISPOT AID® con software AID® ELISpot v.6.0 (AID, Strassberg, Germania). I risultati sono stati espressi come numero di IFN- $\gamma$  SC /  $10^6$  PBMC.

#### **Analisi statistica**

Per l'analisi statistica, per tener conto della non-indipendenza delle osservazioni ripetute fatte sugli stessi soggetti, sono stati applicati i seguenti modelli: modelli lineari a effetti misti (Mixed Effects Linear models-LMEm, dove il tempo è stato considerato una variabile categorica) e modelli generalizzati additivi a effetti misti (Mixed Effects Generalized Additive models-GAMm, dove il tempo è stato trattato come una variabile continua). Sono stati considerati l'effetto tempo (giorno dell'osservazione), del trattamento (cioè la differenza stimata tra i gruppi per la viremia o per i livelli di anticorpi) e la loro interazione (cioè la diversa forma della risposta), come in un esperimento split-plot. Il gruppo di controllo è stato escluso dai modelli di regressione, in quanto si è ipotizzato che una differenza di risposta (numero copie cDNA o valore S/P) tra i soggetti trattati (vaccinazione /inoculazione) e non trattati esistesse già in



accordo con il protocollo sperimentale, mentre l'attenzione è stata focalizzata sulla differenza tra i gruppi sottoposti a trattamento. I valori di  $p$  riportati sono derivati dai modelli LME, dove è stata imposta ai residui una struttura di correlazione autoregressiva. I valori dei campioni negativi in qRT-PCR, ELISA e VN sono stati definiti rispettivamente come numero minimo rilevabile di copie di cDNA, valore S/P e titolo virale. Il numero di copie di cDNA e il titolo di VN sono stati trasformati in valori logaritmici prima delle analisi per soddisfare le ipotesi di distribuzione necessarie per i modelli di regressione. Il punteggio di lesione polmonare e il punteggio istologico sono stati analizzati mediante il test del Chi-quadro e il test esatto di Fisher. Sui dati ELISpot è stato effettuato un confronto statistico tra i gruppi per ogni giorno di campionamento e all'interno dei gruppi nel tempo. Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per rilevare una differenza significativa complessiva, quindi è stato utilizzato il test di confronto multiplo di Dunn (per dati indipendenti) per identificare la/le coppia/e di gruppi responsabili di tale differenza. Quest'ultima analisi è stata effettuata allo stesso modo in primo luogo con il test di Friedman e successivamente con il test di confronto multiplo di Dunn (per dati ripetuti). Per valutare la cross-reattività del vaccino DV nei confronti di PR40, i dati sulla produzione di IFN- $\gamma$  del gruppo vaccinato a seguito di entrambi le stimolazioni ex vivo sono stati confrontati con il test Kruskal-Wallis. Un valore  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo. Il software R (R Core Team, 2017) è stato utilizzato per analizzare i dati e ottenere i grafici, utilizzando "nlme" (Pinheiro e Bates, 2000) e "ggplot2" (Wickham, 2009).



## RISULTATI

### Valutazioni cliniche

I sieri prelevati a 28 dpv da soggetti appartenenti ai gruppi VAC-C e VAC-PR40 sono risultati tutti positivi per gli anticorpi totali specifici PRRSV. Il rapporto S / P medio era di 1,01 e l'immunizzazione degli animali nei due gruppi è stata considerata raggiunta.

Il gruppo di controllo negativo (C) e il vaccinato non infetto (VAC-C) non hanno mostrato febbre e segni clinici per tutta la durata dello studio. Il gruppo VAC-PR40 da 9 a 16 dpi ha presentato una leggera febbre (valore medio di 40,2°C) sempre, comunque, inferiore a 40,5°C con una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) rispetto ai suini non vaccinati (gruppo PR40). Gli animali appartenenti a tale gruppo hanno mostrato una febbre alta (fino a 41,0 ° C) continuativamente da 5 a 24 dpi.

Gli animali del gruppo VAC-PR40 hanno mostrato anche segni clinici lievi a partire da 15 dpi (ad eccezione di uno che mostrava segni respiratorie a 10 dpi), fino a 21 dpi, con un punteggio clinico inferiore a 5 in tutti i soggetti. Gli animali del gruppo PR40 hanno mostrato gravi sintomi clinici, superiori a 7 come punteggio, da 7dpi fino alla fine dello studio. Tutti i suini del gruppo VAC-PR40 sono sopravvissuti fino alla fine dello studio. Al contrario, nel gruppo PR40, due su cinque suini sono morti durante i primi 21 dpi.

### Valutazioni anatomo-patologiche

#### Esame macroscopico

Nei suini del gruppo di controllo negativo (C) e nei suini vaccinati e non infettati (VAC-C) non sono state osservate, macroscopicamente e microscopicamente, lesioni polmonari significative. Le lesioni principali riscontrate nei suini del gruppo PR40 erano l'atrofia del timo e la polmonite interstiziale, spesso complicata da infezione batterica secondaria con un quadro bronco-pneumonico, con iperplasia linfonodale bronchiale. Nei suini VAC-PR40 i punteggi sulla lesione polmonare erano significativamente inferiori ( $p < 0,05$ ) rispetto a quelli di PR40.



### Esame istologico

L'esame istologico ha evidenziato una polmonite interstiziale con linfociti e infiltrazione monocitaria del setto interlobulare nel gruppo PR40 (punteggio istologico medio 3.8): in caso di infezione batterica secondaria, gli agenti responsabili sono stati rilevati a livello del lume bronchiale. I linfonodi bronchiali e il timo nei suini PR40 hanno mostrato atrofia dei centri germinativi e linfocitopenia della medulla lobulare, a causa della deplezione linfocitaria. I maiali nel gruppo VAC-PR40 hanno mostrato una simile deplezione dei linfociti nei linfonodi bronchiali e nel timo, ma in misura significativamente inferiore ( $p < 0,05$ ) (punteggio medio istologico  $< 1,6$ ).

### Esame batteriologico

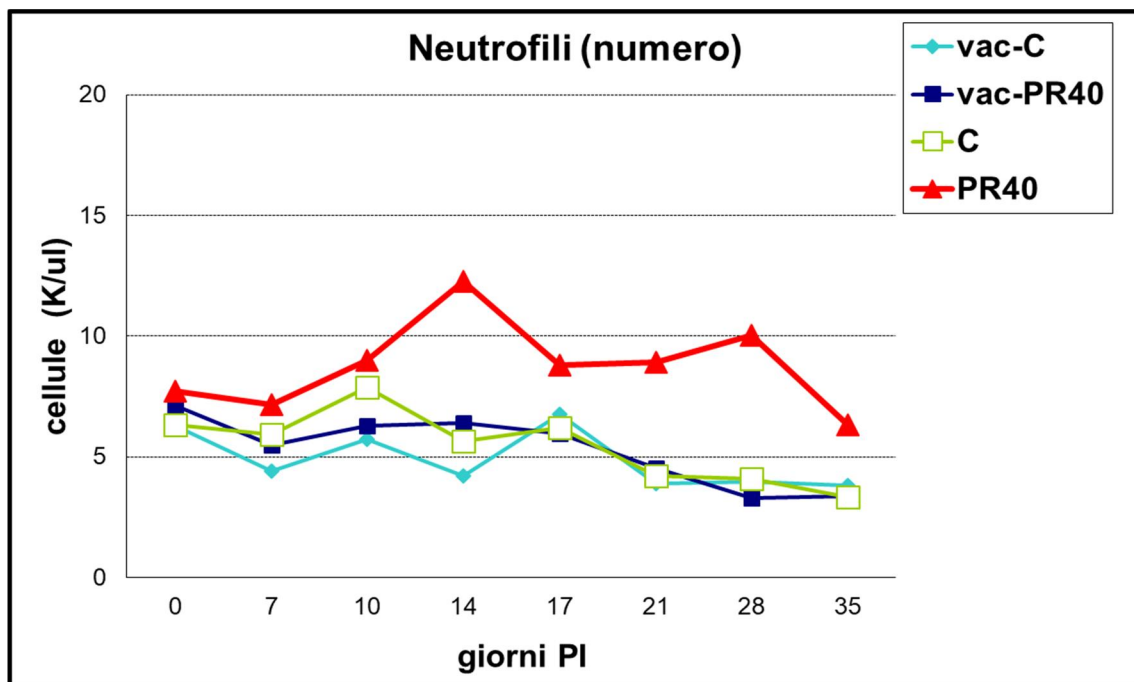
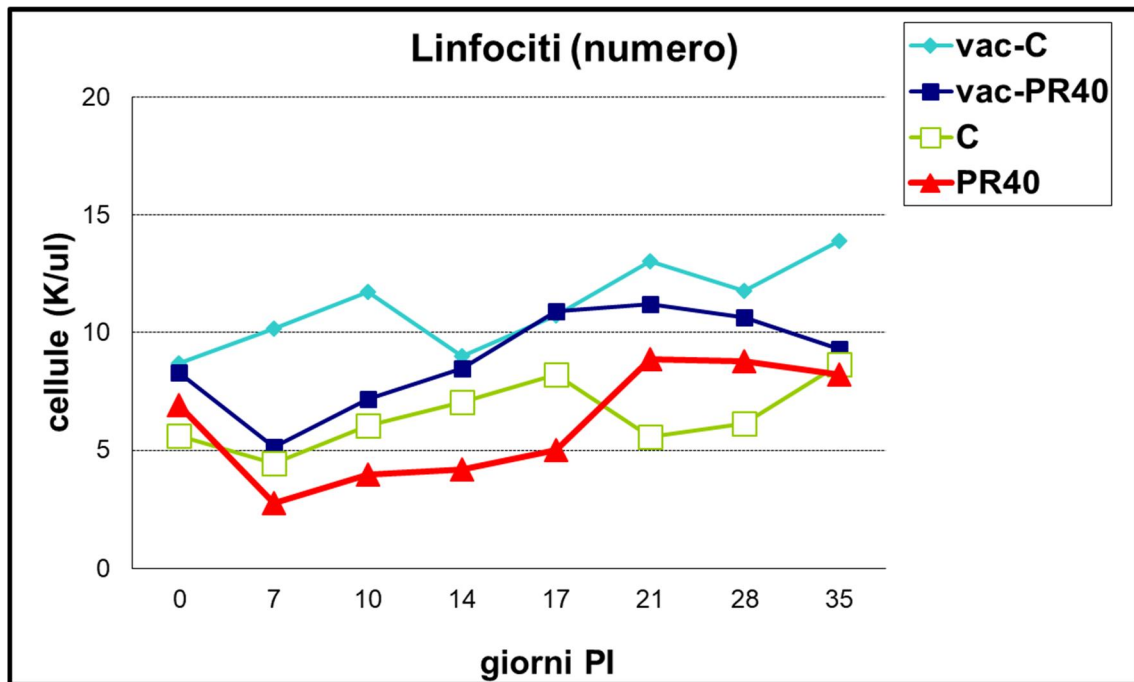
*Streptococcus suis* è stato isolato da polmoni di due animali del gruppo PR40 sottoposti ad eutanasia nelle prime due settimane della sperimentazione. Nessun altro patogeno è stato isolato dai tessuti degli animali prelevati all'esame necroscopico.

## **Valutazioni ematologiche**

I soggetti dei gruppi VAC-PR40 and PR40, al 7° dpi, hanno mostrato un notevole decremento dei leucociti; successivamente, per tutto il periodo dello studio, non sono state rilevate differenze significative. Il numero dei leucociti neutrofili e la loro percentuale sono risultati aumentati nei suini del gruppo infettato con PR40 rispetto ai soggetti vaccinati e ai controlli (fig. 5). Nessun differenza è stata osservata tra i due gruppi vaccinati. Nel gruppo VAC-C, il valore dei linfociti, tra 0-10 dpi, e a 14 dpi, rispettivamente, si è mantenuto a livelli più alti rispetto a tutti gli altri gruppi. Nei gruppi infettati con PR40 (VAC-PR40 e PR40), il numero dei linfociti è drasticamente diminuito al 7° dpi, per poi gradualmente incrementare dopo 14 dpi (fig. 5). I suini appartenenti al gruppo PR40, dal 7° dpi e per tutta la durata dello studio, hanno mostrato percentuali di leucociti più basse in confronto agli altri gruppi, così come valori eritrocitari, emoglobina e valori di ematocrito sono stati significativamente più bassi dal 14° al 35° dpi. Per i gruppi vaccinati, i valori di ematocrito hanno avuto titoli più alti rispetto ai soggetti del gruppo



di controllo a 21-28 dpi. I valori piastrinici dei suini infettati con PR40 hanno mostrato, dal 10 al 21 dpi, livelli più bassi se confrontati con i valori di tutti gli altri gruppi.

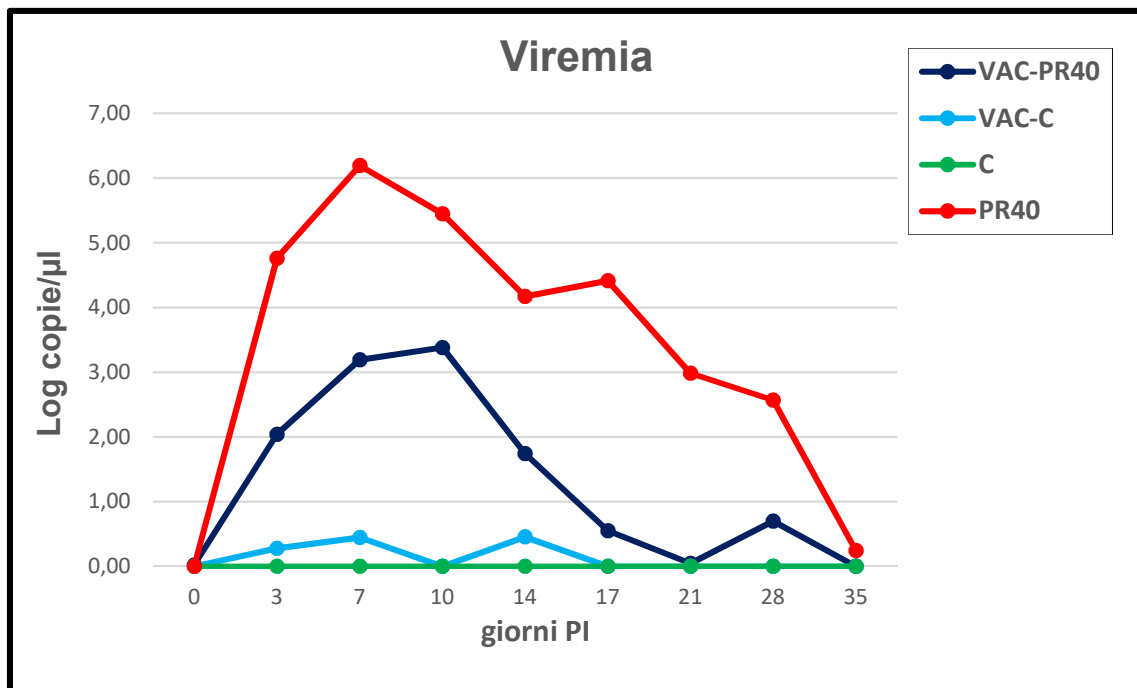


**Figura 5:** Livelli di linfociti (sopra) e neutrofili (sotto) nel sangue del gruppo vaccinato non infetto (vac-C), nel gruppo vaccinato infetto (vac-PR40), nel gruppo di controllo (C), nel gruppo infetto con PR40 (PR40).



## Valutazioni virologiche

Al momento della vaccinazione e al momento della infezione, tutti i maiali erano negativi per la ricerca di RNA PRRSV. Le medie del numero di copie RNA virali del siero nei gruppi PR40 e VAC-PR40 hanno cominciato ad aumentare a 3 dpi, con un picco a 7 dpi e 10 dpi, rispettivamente. La viremia persisteva fino a 28 dpi nel gruppo PR40, mentre nel gruppo infetto vaccinato, la viremia diminuiva rapidamente dopo il picco a 10 dpi, in modo da scomparire a 14 dpi (fig. 6): il titolo viremico di quest'ultimo si è mantenuto sempre inferiore rispetto al gruppo PR40. PRRSV non è stato rilevato nei sieri degli animali del gruppo di controllo e nel vaccinato non infetto in tutto il periodo dell'esperimento.



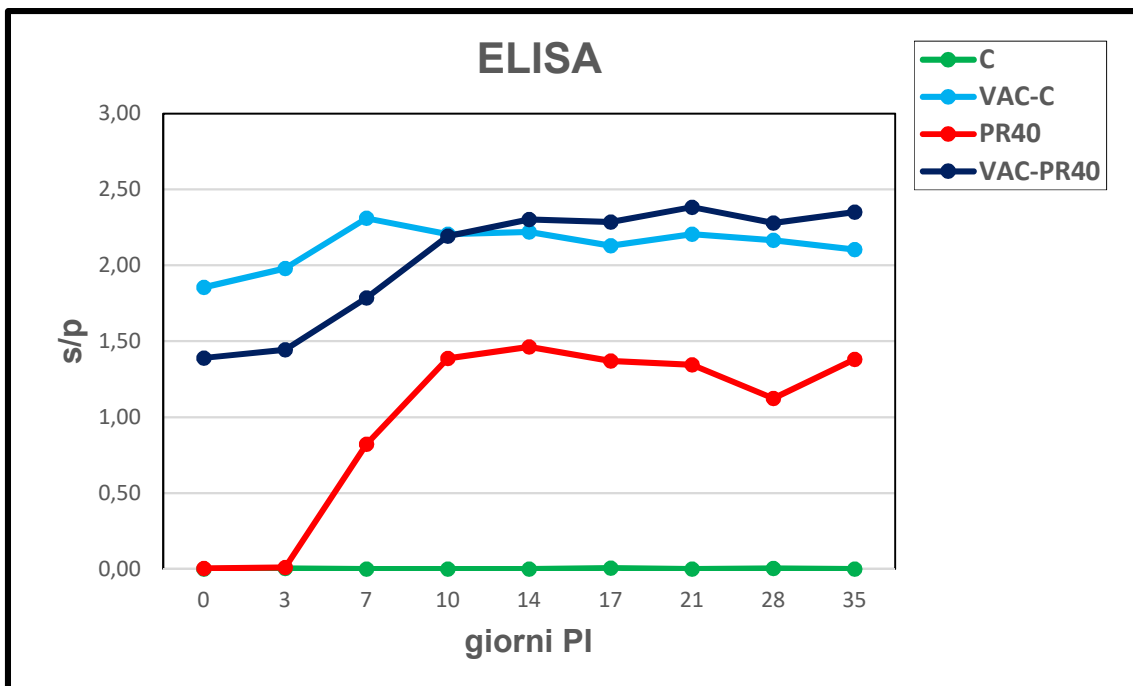
**Figura 6:** Valori di viremia, espressa come Log cdNA (numero/μl) di PRRSV, nei gruppi VAC-PR40, VAC-C, C e PR40.



## Valutazioni immunologiche

### Sierologia

Tutti gli animali vaccinati hanno mostrato anticorpi ELISA specifici PRRSV durante tutto lo studio (fig.7). Nei suini PR40, la risposta immunitaria anticorpale inizia a salire dopo 7 dpi, raggiungendo il picco principale a 10 dpi: durante la sperimentazione, il loro titolo anticorpale è stato inferiore rispetto al titolo del gruppo VAC-PR40, dove si è osservato un effetto booster dopo 10 giorni dall'inoculazione virale. La differenza nel livello del rapporto S/P tra i due gruppi è significativa ( $p < 0.01$ ). I suinetti infetti vaccinati hanno avuto una reazione VN rilevabile ma bassa (tra  $2^3$  e  $2^5$  log) al virus PR40 a partire da 7 dpi fino alla fine dello studio. I suini del gruppo PR40 hanno mostrato anticorpi VN al virus omologo a partire da 17 dpi, con un picco a 21 dpi, ma il titolo era molto basso ( $< 2^3$  log).



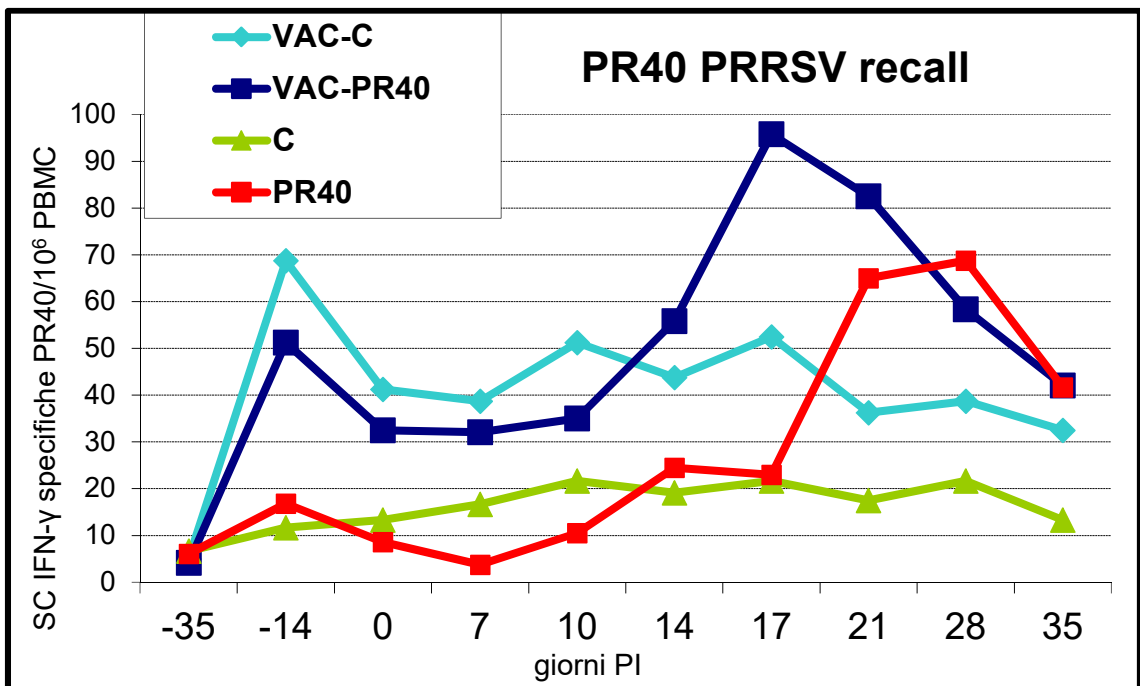
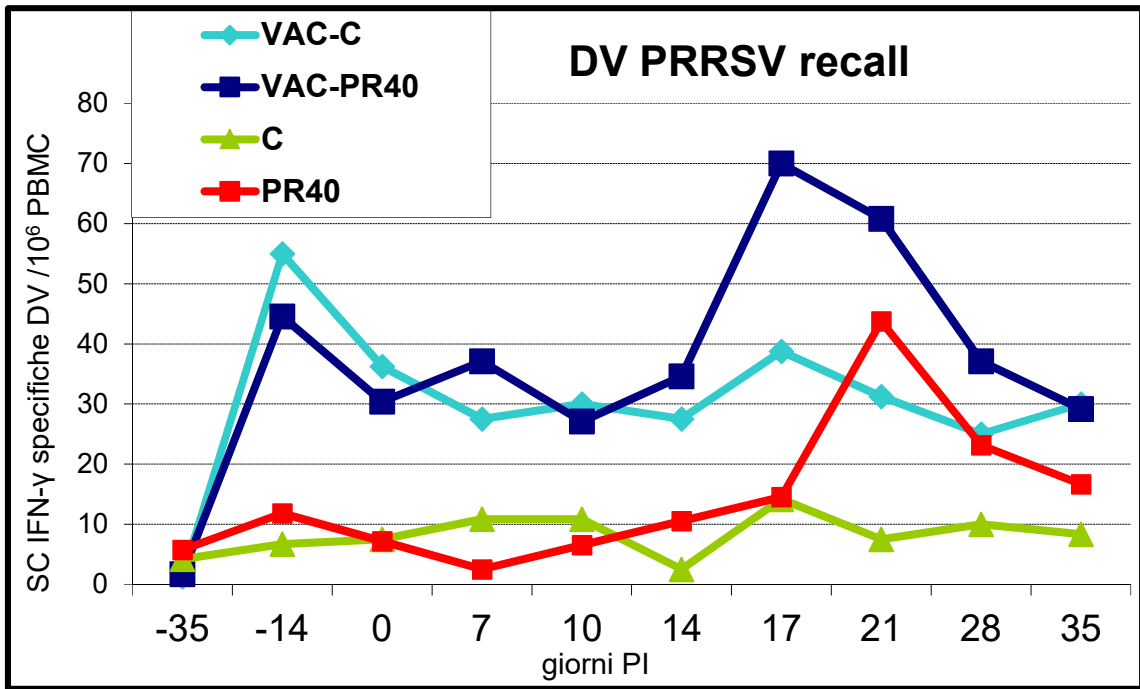
**Figura 7:** Anticorpi ELISA specifici PRRSV nei gruppi VAC-PR40, VAC-C, C e PR40.



### ELISPOT IFN- $\gamma$

La valutazione del numero di cellule secernenti IFN- $\gamma$  specifica per il ceppo DV e per l'isolato PR40 ha messo in evidenza che i suini vaccinati hanno presentato una risposta significativa a entrambi i ceppi a 21 dpv (- 14 giorni dall'infezione) (fig.8). Nel complesso, in tutti i gruppi la risposta indotta dalla stimolazione in vitro con PR40 è risultata paragonabile alla risposta indotta da DV: tuttavia, nei suini VAC-PR40 il richiamo con l'isolato PR40 ha avuto una risposta con un picco più elevato a 17 dpi. Tale gruppo ha mostrato un aumento del numero di cellule secernenti IFN- $\gamma$  a partire dal 14° giorno dall'infezione, incremento non osservato nel gruppo vaccinato non infetto e a 35 dpi i valori sono ritornati a livelli di pre-infezione. I suini PR40 re-stimolati con DV o PR40 hanno mostrato una efficace risposta, raggiungendo il picco tra 17 e 35 dpi: con l'isolato PR40 la risposta è apparsa più pronunciata e duratura. Gli animali VAC-PR40 hanno avuto una risposta precoce e più intensa rispetto al gruppo PR40. Negli animali di controllo non si è avuta nessuna risposta cellulo-mediata.





**Figura 8.** Risposta cellulo-mediata specifica per PRRSV, dopo re-call con ceppo vaccinale DV (sopra) e con isolato PR40 (sotto). Le cellule secernenti IFN- $\gamma$  sono espresse come numero di cellule in  $1 \times 10^6$  PBMC.



## DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Nei paesi a suinicoltura intensiva, l'infezione da PRRSV causa ingenti perdite in allevamento, tanto da essere considerata una delle maggiori cause di danno economico dell'industria suinicola mondiale. PRRSV è caratterizzato da ampie differenze genetiche non solo tra i due genotipi riconosciuti, ma anche all'interno di essi, portando alla classificazione in diversi sottotipi. Le differenze tra ceppi e isolati sono responsabili in vivo di vari pattern di patogenicità (Martinez-Lobo et al., 2011). Recentemente alcune varianti virulente del virus (definiti ceppi altamente patogeni) hanno causato gravi epidemie di PRRS in molti paesi dell'Asia sudorientale e in Europa, con tassi di mortalità insolitamente elevati nei suini di tutte le età: la loro gravità ha suscitato preoccupazioni circa l'efficacia dei vaccini disponibili in commercio contro questi ceppi. Come conseguenza, sono stati recentemente testati, in campo, diversi vaccini nei confronti di isolati HP-PRRSV e i risultati hanno evidenziato una parziale protezione (Roca et al., 2012; Wei et al., 2013; Do et al., Trus et al. 2014; Bonckaert et al., 2016). Negli anni, diversi studi avevano già messo in evidenza la cross-protezione tra i vari ceppi PRRSV a normale patogenicità (Mengeling et al., 2003; Opriessnig et al., 2005; Ferrari et al., 2013; Park et al., 2014; Weesendorp et al., 2013), ma il limite, in ambedue i casi, come è costantemente segnalato per l'infezione da PRRSV, è prevedere il grado e la forza della immunità trasversale protettiva.

Nel presente studio è stata effettuata un'infezione sperimentale comparativa tra ceppo PRRSV (PRRSV1\_PR40 / 2014), agente causale di un "episodio atipico di PRRS" in Italia e un ceppo PRRSV (PRRSV1\_PR11 / 2014) proveniente da un focolaio italiano con un andamento classico della malattia. Nell'ambito dello stesso studio, è stata testata l'efficacia di un vaccino commerciale attenuato, allestito con il ceppo europeo PRRSV-1, nei confronti del nuovo isolato virale. PRRSV-40 ha causato gravi segni clinici negli animali in accrescimento, tra cui febbre alta, distress respiratoria e elevati tassi di mortalità. Tale studio ha fornito una maggiore conoscenza delle caratteristiche fenotipiche, patologiche e immunologiche della Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome da virus ad elevata patogenicità, primo isolato italiano in letteratura, in quanto i risultati clinici e patologici sono simili a quelli osservati in campo.



È stato analizzato filogeneticamente il genoma totale del PR40: esso clusterizza in un lineage differente all'interno del genotipo 1, sottotipo 1 e ha due delezioni amminoacidiche nella regione che codifica NSP2. NSP2 è una proteina multi-dominio e multifunzionale e il gene NSP-2 è la regione più variabile del genoma virale PRRSV (Fang et al., 2004). I ceppi cinesi HP-PRRSV e Lena hanno una caratteristica comune, vale a dire una discontinuità nella regione di codifica NSP2 (Li et al. 2007; Zhou et al., 2010). Il rapporto tra questa delezione e la virulenza del ceppo è difficile da determinare (Wang et al., 2013) e i risultati di diversi studi spesso sono contraddittori (Fang et al., 2004; Han et al., 2006; Wang et al., 2013). Tuttavia, si suppone che gli epitopi di NSP2 possono anche svolgere un ruolo nella modulazione dell'immunità dell'ospite: NSP2 è un antagonista virale della difesa dell'ospite e sembra essere una proteina altamente immunogena (Chen et al., 2010). I risultati del presente studio sull'isolato PR40 rafforzerebbero l'ipotesi che le delezioni in questa regione costituiscano una caratteristica genetica importante, associata a differente patogenicità in vivo e fortemente correlata con la differente immunomodulazione dell'ospite nei confronti dell'isolato.

La patogenicità dipende da molti fattori, tra cui l'efficienza di diffusione del virus nell'ospite, il tropismo dei tessuti e la capacità di evasione immunitaria, insieme alle infezioni batteriche secondarie associate (Han et al., 2017). I ceppi PRRSV altamente patogeni presentano alti livelli di viremia di lunga durata ed elevati valori di carica virale nei tessuti, inducono risposte immunitarie umorali più rapide e più intense e segni clinici più gravi negli animali infetti (Frydas e Nauwynck, 2016, Johnson et al. 2004; Karniychuk et al., 2010).

Nel nostro studio, il confronto tra parametri correlati alla virulenza (segni clinici, febbre e mortalità), e altri parametri quali ADWG, viremia, profili sierologici, lesioni anatomiche patologiche dei due isolati, ha confermato che PR40 possiede le caratteristiche di un isolato PRRSV ad alta patogenicità rispetto a PR11. I maiali infetti con PR40 mostravano segni clinici significativamente più gravi e una febbre duratura: i soggetti PR40 e PR11 hanno iniziato a mostrare la febbre rispettivamente a 2 dpi e 3 dpi, mentre la temperatura media rettale nel gruppo PR40 è rimasta superiore a 40 ° C da 5 a 24 dpi. Non sono state osservate differenze di mortalità rispetto ai due gruppi sperimentali. Le



infezioni secondarie con altri agenti patogeni batterici potrebbero avere un ruolo importante nell'esacerbare i sintomi in condizioni sperimentali, escludendo la possibilità di registrare le differenze tra i due gruppi. Le lesioni macroscopiche hanno mostrato polmonite interstiziale da moderata a grave in entrambi i gruppi: l'analisi istopatologica ha confermato che l'estensione e la gravità della polmonite interstiziale, l'atrofia del timo e la linfocitopenia dei linfonodi bronchiali sono caratteristiche peculiari del virus PR40 ad alta patogenicità. I soggetti infetti con il ceppo altamente virulento hanno mostrato una grave diminuzione di linfociti B e, in particolare, di sottopopolazioni dei linfociti T negli organi linfoidei. Infatti, è già stato descritto che PRRSV altamente patogeni inducono atrofia grave del timo, deplezione di cellule linfocitarie T, influenzano lo sviluppo di cellule T naïve e la qualità della nuova cellula T del timo, predisponendo i suinetti ad una debole immunità (Han et al., 2017). Questi effetti sono confermati nelle condizioni di questo studio. Di conseguenza, la PR40, come altri HP-PRRSV, sembra indurre una risposta anticorpale neutralizzante ritardata: nonostante un profilo sierologico molto simile in ELISA, i livelli di anticorpi neutralizzanti nei suini inoculati PR40 sono aumentati dopo una settimana e con titoli inferiori rispetto al PR11. Questa risposta anticorpale neutralizzante nei confronti del virus omologo potrebbe essere una caratteristica specifica dell'isolato PR40 in termini di disregolazione dell'immunità dell'ospite.

Nella sperimentazione 2, i suini che sono stati prima vaccinati con MVL PRRSV-1, e successivamente infettati con PR40, hanno mostrato una malattia clinicamente più contenuta, sia in termini di gravità che di durata dei sintomi (minore febbre, mortalità e riduzione delle lesioni patologiche) rispetto al gruppo dei suini infettati con PR40. Le migliori condizioni generali e le più lievi caratteristiche patologiche nel gruppo VAC-PR40, dovute all'assenza di infezioni secondarie, sono state confermate anche dai risultati delle analisi ematologiche rispetto al gruppo PR40: la durata (tre settimane meno) e i livelli (picco di tre log<sub>2</sub> in meno) di viremia erano significativamente ridotti rispetto ai soggetti non vaccinati. I valori di anticorpi VN dopo il challenge nei due gruppi infetti non hanno raggiunto titoli elevati (considerando che la durata dello studio sperimentale è di soli 35 dpi), ma il loro confronto evidenzia una risposta virus-neutralizzante più precoce e potenziata nel gruppo VAC-PR40. Inoltre, il numero di



linfociti nel sangue era più elevato nel gruppo vaccinato e non infettato, mentre nei gruppi VAC-PR40 e PR40, diminuisce fortemente a 7 dpi, per poi aumentare gradualmente dopo 14 dpi, ipotizzando così un coinvolgimento, nel controllo della infezione, dei leucociti. Infatti, la risposta cellulo-mediata, valutata come cellule secernenti IFN- $\gamma$ , nel gruppo VAC-PR40 ha cominciato a salire a 17 dpi, insieme agli anticorpi VN, e tale profilo è rimasto simile per tutta la durata dello studio. La risposta dei linfociti T di memoria nei suini VAC-PR40 è avvenuta precocemente rispetto alla risposta cellulare primaria negli animali PR40, ed è in grado di contrastare in anticipo l'infezione da PRRSV, assumendo un ruolo nella protezione parziale dimostrata negli animali precedentemente vaccinati. Ciò dimostra che la vaccinazione con il MLV può stimolare una reattività immunitaria crociata in grado di rispondere efficacemente a PR40. I risultati ottenuti confermano i dati di studi precedenti (Martelli et al., 2009; 2013; Ferrari et al., 2013); in particolare le cellule T stimulate dal ceppo vaccinale possono contribuire efficacemente alla clearance virale anche contro un PRRSV eterologo e altamente patogeno, indipendentemente dai livelli ematici rilevati prima e subito dopo l'infezione. Tenendo conto di tutti questi dati, la diminuzione più rapida del titolo viremico nel gruppo VAC-PR40 rispetto a quella PR40 sembra essere associata con un maggiore incremento simultaneo di entrambe le immunità, innata e cellulare. L'elevata viremia di PRRSV è associata allo sviluppo di una grave polmonite interstiziale (Han et al., 2013); la riduzione della durata e i valori più bassi di viremia mediati dal vaccino è un punto critico nel controllo delle conseguenze dell'infezione. Comunque, non è chiaro come l'immunità cellulare e umorale contribuisca a inibire la replicazione virale nei suini (Iseki et al., 2017), ma entrambi possono svolgere un ruolo essenziale nella clearance PRRSV (Mulupuri et al., 2008; Wesley et al. 2006). Nel gruppo VAC-PR40 le manifestazioni cliniche più lievi (viremia e febbre) e le lesioni anatomo-patologiche meno gravi possono confermare i risultati di Iseki et al. (2017), che indicano come il vaccino contribuisca maggiormente alla clearance virale nei tessuti infetti, piuttosto che all'inibizione della proliferazione virale nella fase iniziale dell'infezione (Iseki et al., 2017).

In conclusione, questo studio ha descritto e confermato *in vivo* le principali caratteristiche cliniche, virologiche, patologiche e sierologiche di un isolato italiano



PRRSV 1.1 ad alta patogenicità, nei confronti del quale il vaccino in esame MVL PRRSV-1 ha fornito una cross protezione parziale, confermando i risultati di altri studi (Iseki et al., 2017; Trus et al., 2014; Bonckaert et al., 2016) sull'induzione di una protezione parziale dei vaccini vivi modificati nei confronti di isolati altamente virulenti di PRRS.



## BIBLIOGRAFIA

1. Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A. 2000. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Description of Persistence in Individual Pigs upon Experimental Infection. *J. Virol.* Vol. 74, No. 22, p. 10834-10837.
2. Amarilla, S.P., Gómez-Laguna, J., Carrasco, L., Rodríguez-Gomez, I.M., Caridad y Ocerin, J.M., Graham, S.P., Frossard, J.P., Steinbach, F., Salguero, F.J., 2016. Thymic depletion on lymphocytes is associated with the virulence of PRRSV-1 strains. *Vet. Microbiol.* 188, 47-58
3. An T.Q., Tian Z.J., Zhou Y.J., Xiao Y., Peng, J.M., Chen J., Jiang Y.F., Hao X.F., Tong G. Z., 2011. Comparative genomic analysis of five pairs of virulent parental/ attenuated vaccine strains of PRRSV. *Vet. Microbiol.* 149, 104–112.
4. Balka, G., Hornyák, Á., Dán, Á., Ladinig, A., Biksi, I., Rusvai, M., 2010. PriProET based melting point analyses on PRRSV positive field samples. *Mol. Cell. Probes* 1-4.
5. Bautista E.M., Meulenber J.J., Choi C.S., Molitor T.W. 1996. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 141, 1357-136.
6. Bonckaert C, Van der Meulen K, Rodríguez-Ballara I, Sanz P, Fenech Martinez P, Nauwynck H.,2016. Modified-live PRRSV subtype 1 vaccine UNISTRAIN PRRS provides a partial clinical and virological protection upon challenge with East European subtype 3 PRRSV strain Lena. *Porcine Health Management*, 2:12.
7. Borghetti, P., Saleri, R., Ferrari, L., Morganti, M., De Angelis, E., Franceschi, V., Bottarelli, E., Martelli, P. 2011. Cytokine expression, glucocorticoid and growth hormone changes after porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) infection in vaccinated and unvaccinated naturally exposed pigs *Comparative Immunology. Clin. Microbiol. Infect.* 34, 143–155.
8. Brockmeier SL, Loving CL, Nelson EA, Miller LC, Nicholson TL, Register KB, Grubman MJ, Brough DE, Kehrl ME, 2012. The presence of alpha interferon at the time of infection alters the innate and adaptive immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Vaccine Immunol* ; 12: 508-514
9. Butler J.E., Lager K.M., Golde W., Faaberg K.S., Sinkora M., Loving C., Zhang Y.I., 2014. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. *Immunol. Res.* 59, 81-108.
10. Canelli E, Catella. A, Borghetti P., Ferraria L., Ogno G., De Angelis E., Corradi A., Passeri B., Bertani V., Sandri G., Bonilauri P., Leung F.C., Guazzetti S., Martelli P., 2017. Phenotypic characterization of a highly pathogenic Italian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) type 1 subtype 1 isolate in experimentally infected pigs *Veterinary Microbiology* 210 124–133
11. Chen G.Y., Tang, J., Zheng, P., Liu, Y., 2009. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science.* 323, 1722-1725.



12. Chen Z., Zhou X., Lunney J.K., Lawson S., Sun Z., Brown E., Christopher-Hennings J., Knudsen D., Nelson E., Fang Y., 2010. Immunodominant epitopes in nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response. *J. Gen. Virol.* 91(4), 1047-1057.
13. Cho, J.G. e Dee, S.A., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 66, 655-662.
14. Darwich L., Diaz I., Mateu E., 2010. Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Res.* 154, 123-132.
15. Dea S., Bilodeau R., Athanassios R., Sauvageau R., Martineau G.P. 1992. Swine reproductive and respiratory syndrome in Québec: Isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *J. Vet.* 33(12):801-8.
16. Desrosiers R., Boutin M. 2002. An attempt to eradicate porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) after an outbreak in a breeding herd: eradication strategy and persistence of antibody titers in sows. *J. Swine Health Prod.* 10(1):23-25.
17. Díaz I., Gimeno M., Darwich L., Navarro N., Kuzemtseva L., López S., Galindo I., Segalés J., Martin M., Pujols J., Mateu E., 2012. Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Res.* 43, 30.
18. Do DT, Park C, Choi K, Jeong J, Nguyen TT, Nguyen KD, Chae C., 2015. Comparison of two genetically distant type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) modified live vaccines against Vietnamese highly pathogenic PRRSV. *Vet Microbiol*, 179:233–241
19. Fang Y., P. Schneider W.P. Zhang K.S., Faaberg, Nelson E.A., Rowland R.R., 2007. Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: Analysis of isolates collected between 1999 and 2004. *Arch. Virol.*, 152: 1009-1017
20. Fang Ying, Kim Dal-Young, Ropp Susan, Steen Pam, Christopher-Hennings Jane, Nelson Eric A. , Rowland Raymond R.R., 2004. Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States *Virus Research* 100; 229–235
21. Ferrari L., Martelli P., Saleri R., De Angelis E., Cavalli V., Bresaola M., Benetti M., Borghetti P., 2013. Lymphocyte activation as cytokine gene expression and secretion is related to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate after in vitro homologous and heterologous recall of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from pigs vaccinated and exposed to natural infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151, 193-206.
22. Ferrarini G., Borghetti P., De Angelis E., Ferrari L., Canelli E., Catella A., Di Lecce R., Martelli P., 2015. Immunoregulatory signal FoxP3, cytokine gene expression and IFN- $\gamma$  cell responsiveness upon porcine reproductive and respiratory



- syndrome virus (PRRSV) natural infection. *Research in Veterinary Science* 103, 96–102
23. Frydas I.S., Trus I., Kvisgaard L.K., Bonckaert C., Reddy V.R., Li Y., Larsen L.E., Nauwynck H.J., 2015. Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates. *Vet Res.* 46: 37. (doi: 10.1186/s13567-015-0166-3.)
  24. Gimeno M., Darwich L., Diaz I., de la Torre E., Pujols J., Martín M., Inumaru S., Cano E., Domingo M., Montoya M., Mateu E., 2011. Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. Res.* 42, 1-9.
  25. Halbur P.G., Paul P.S., Frey M.L., Landgraf J., Eernisse K., Meng X.J., 1995. Comparison of the pathogenicity of 2 Us Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus isolates with that of the Lelystad Virus. *Vet. Path.* 32(6):648-60.
  26. Han D., Hu Y., Li L., Tian H., Chen Z., Wang L., Ma H., Yang H., Teng K., 2014. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection results in acute lung injury of the infected pigs. *Veterinary Microbiology* 169,135–146
  27. Han J., Zhou L., Xinna Ge., Xin G., Yang H. 2017. Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* (In press. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.02.020)
  28. Han J., 2017. Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 134-154.
  29. Han Jun, Wang Yue, Faaberg Kay S., 2006. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus *Virus Research* 122; 175–182
  30. Han K, Seo HW, Park C, Kang I, Han HJ, Kim SH, Chae C., 2013. Comparative pathogenicity of three Korean and one Lelystad type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (pan-European subtype 1) isolates in experimentally infected pigs. *J Comp Pathol* 149: 331-340
  31. Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod.* 2013;21(2):72–84
  32. Hu S.P., Zhang Z., Liu Y.G., Tian Z.J., Wu D.L., Cai X.H., He X.J., 2013. Pathogenicity syndrome virus in pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* 60,351-359.
  33. Iseki H, Kawashima K, Tung N, Inui K, Ikezawa M, Shibahara T, Yamakawa M., 2017. Efficacy of Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine against the 2010 isolate of Vietnamese highly pathogenic PRRSV challenge in pigs. *J Vet Med Sci*, 79: 765–773
  34. Karniychuk U.U., Geldhof M., Vanhee M., Van Doorselaere J., Saveleva T.A., Nauwynck H.J. 2010. Pathogenesis and antigenic characterization of a new East



- European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC. Vet. Res.* 6, 30-9. (doi: 10.1186/1746-6148-6-30)
35. Kim H, Kim HK, Jung JH, Choi YJ, Kim J, Um CG, Hyun SB, Shin S, Lee B, Jang G, Kang BK, Moon HJ, Song DS., 2011. The assessment of efficacy of porcine reproductive respiratory syndrome virus inactivated vaccine based on the viral quantity and inactivation methods. *Viol J*, 8: 323-327
  36. Li L., Zhao Q., Ge X., 2012. Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus exhibits more extensive tissue tropism for pigs. *J. Virol.* 9:203.
  37. Li Y., Wang X., Bo K., Tang B., Yang B., Jiang W., Jiang P., 2007. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet. J.* 174, 577-584
  38. Liu, X., Bai, J., Wang, H., Fan, B., Li, Y., Jiang P. 2015. Effect of amino acids residues 323–433 and 628–747 in Nsp2 of representative porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on inflammatory response in vitro. *Virus Res.* 208, 13-21.
  39. Marcato, P.S., *Patologia sistematica veterinaria Volume I, II edizione, Edagricole.* 2015; 606-607
  40. Martelli P., Ardigò P., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Bonilauri P., Luppi A., Guazzetti S., Caleffi A., Borghetti P. 2013. Concurrent vaccinations against PCV2 and PRRSV: study on the specific immunity and clinical protection in naturally infected pigs. *Vet. Microbiol.* 162(2-4), 558-71. (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.016)
  41. Martelli P., Baricco G., Bonilauri P., Borghetti P., Caleffi A., Candotti P., Canelli E., Cavirani S., De Mila G.M., Feliziani F., Foni E., Guazzetti S., Haesebrouck F., Kramer L.H., Luppi A., Maes D., Magistrali C.M., Merialdi G., Nauwynck H., Rosignoli C., Rota Nodari S., Ruga G., Sala V., Segalés J. 2013. *Le Patologie del Maiale, I edizione, Point Veterinaire Italiane*, 80-83, 361-392.
  42. Martelli P., Gozio S., Ferrari L., Rosina S., De Angelis E., Quintavalla C., Bottarelli E., Borghetti P. 2009. Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity. *Vaccine.* 27(28):3788-99. (doi: 10.1016/j.vaccine.2009.03.028)
  43. Martinez-Lobo F.J., Diez-Fuertes F., Segales J., Garcia-Artiga C., Simarro I., Castro J.M., Prieto C., 2011. Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model *Veterinary Microbiology* 154, 58–68
  44. Meier, W.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Osorio, F.A., Lunney, J.K., Zuckermann, F.A., 2004. Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 299-314.



45. Mengeling W.L., Lager K.M., Vorwald A.C. 1998. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of “atypical” PRRS. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1540-1544.
46. Mengeling W.L., Lager K.M., Vorwald A.C., Clouser D.F., 2003. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Microbiol.* 93, 25–38.
47. Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. 2000. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Anim. Reprod. Sci.* 60 61:199-210.
48. Meulenber, J.J., Van Nieuwstadt, A.P., Van Essen-Zandbergen, A., Bos-de Ruijter, J.N., Langeveld, J.P., Melen, R.H. 1998. Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies. *Virology* 252(1):106-14.
49. Miller L. C., Laegreid W.W., Bono J. L., Chitko-McKown C. G., J. M. 2004 Fox Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells *Arch Virol* 149: 2453–2463
50. Mulupuri P, Zimmerman JJ, Hermann J, Johnson CR, Cano JP, Yu W, Dee SA, Murtaugh MP. Antigen-specific B-cell responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Virol* 2008; 82: 358–370. doi: 10.1128/JVI.01023-07
51. Murtaugh M.P., Stadejek T., Abrahante J.E., Lam T.Y., Leung C.C. 2010. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154, 18-30.
52. Nieuwenhuis N., T. F. Duinhof, A. van Nesal. (2012) “Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds” *Vet rec* 170:225
53. Opriessnig T, Pallares FJ, Nilubol D, Amy L. Vincent, Eileen L. Thacker, Eric M. Vaughn, Michael Roof, Patrick G. Halbur, 2005. Genomic homology of ORF 5 gene sequence between modified live vaccine virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge isolates is not predictive of vaccine efficacy. *J Swine Health Prod*, 13: 246–253
54. Park C, Choi K, Jeong J, Chae C., 2015. Cross-protection of a new type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) *Veterinary Microbiology*, 177, 87–94
55. Roca M, Gimeno M, Bruguera S, Segales J, Diaz I, Galindo-Cardiel JJ, et al. Effects of challenge with a virulent genotype II strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on piglets vaccinated with an attenuated genotype I strain vaccine. *Vet J* 2012; 193:92–6
56. Shi M., Lam T.T., Hon C.C., Hui R.K., Faaberg K.S., Wennblom T., Murtaugh M.P., Stadejek T., Leung F.C. 2010. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res.* 154, 7-17.



57. Stadejek T., Stankevicius A., Murtaugh M.P., Oleksiewicz M.B. 2013. Molecular evolution of PRRSV in Europe. *Vet. Microbiol.* 165, 21-28.
58. The Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, 2016 Highly pathogenic Porcine reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Swine Health Information Center (SHCI).
59. Tian K., Yu X., Zhao T., Feng Y., Cao Z., Wang C., Hu Y., Chen X., Hu D., Tian X., Liu D., Zhang S., Deng X., Ding Y., Yang L., Zhang Y., Xiao H., Qiao M., Wang B., Hou L., Wang X., Yang X., 2007. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS One.* 2(6): e526.
60. Trus I, Bonckaert C, van der Meulen K, Nauwynck HJ. Efficacy of an attenuated European subtype 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs upon challenge with the East European subtype 3 PRRSV strain Lena. *Vaccine* 2014; 32: 2995–3003. (doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.077)
61. Van Breedam, W., Delputte, P.L., Van Gorp, H., Misinzo, G., Vanderheijden, N., Duan, X., Nauwynck, H.J. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J. Virol.* 91(Pt 7):1659-67.
62. Wang D., Cao L., Xu Z., Fang L., Zhong Y., Chen Q., Luo R., Chen H., Li K., Xiao S. 2013. MiR-125b reduces porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by negatively regulating the NF-kappaB pathway. *PLoS One* 8, e55838
63. Wang R. and Zhang Y-J. 2014. Antagonizing Interferon-Mediated Immune Response by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *BioMed Res. Int.* (doi:10.1155/2014/315470)
64. Weesendorp E, Morgan S, Stockhofe-Zurwieden N, Popma-De Graaf DJ, Graham SP, Rebel JM. 2013. Comparative analysis of immune responses following experimental infection of pigs with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of differing virulence. *Vet Microbiol* 163:1–12 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.09.013).
65. Weesendorp E., Rebel J.M., Popma-De Graaf D.J., Fijten H.P., Stockhofe-Zurwieden N. 2014. Lung pathogenicity of European genotype 3 strain porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) differs from that of subtype 1 strains. *Vet. Microbiol.* 174, 127-138.
66. Wei Z, Zhang J, Zhuang J, Sun Z, Gao F, Yuan S. 2013 Immunization of pigs with a type 2 modified live PRRSV vaccine prevents the development of a deadly long-lasting hyperpyrexia in a challenge study with highly pathogenic PRRSV JX143. *Vaccine*, 31: 2062–2066
67. Zhao H., Han Q., Zhang L., Zhang Z., Wu Y, Shen H, Jiang P. 2017. Emergence of mosaic recombinant strains potentially associated with vaccine JXA1-R and predominant circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in different provinces of China. *Virol J.* Apr 4;14(1):67. doi: 10.1186/s12985-017-0735-3.



68. Zhou L., Yang H., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Res.* 154, 31-37.
69. Zhou, L., Wang, Z., Ding, Y., Ge, X., Guo, X., Yang, H., 2015. NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. China. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 2256-2257.
70. Zimmerman, J.J., Benfield, D.A., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Stevenson, G.W., Torremorell, M. 2012. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). *Diseases of swine 10th edition*, Wiley-Blackwell Publishing 461-486.
71. Zuckermann F.A., Garcia E.A., Luque I.D., Christopher-Hennings J., Doster A., Brito M., Osorio F. 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet. Microbiol.* 123, 69-85.



