

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA  
DIPARTIMENTO DI  
PATOLOGIA ANIMALE, IGIENE E SANITA' PUBBLICA VETERINARIA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE VETERINARIE E  
ZOOTECNICHE  
CICLO XXIII

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA  
INFEZIONE DI CAMPO DA VIRUS *DELLA PORCINE REPRODUCTIVE AND  
RESPIRATORY SYNDROME* (PRRSV): VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA  
IMMUNITARIA IN SUINI NAÏVE E SOTTOPOSTI A VACCINAZIONE

VET/05

DOTTORANDA  
Silvia Dotti

TUTOR  
Prof. Luigi Bonizzi

COORDINATORE DEL DOTTORATO  
Prof. Fulvio Gandolfi

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

# **Parte Generale**

|                                           |        |
|-------------------------------------------|--------|
| <b>1. Introduzione</b>                    | pag 2  |
| 1.1 Caratteristiche Agente Eziologico     | pag 5  |
| 1.2 Epidemiologia e Patogenesi            | pag 8  |
| 1.3 Risposta Immunitaria e Sintomatologia | pag 13 |
| 1.4 Diagnosi                              | pag 26 |
| 1.5 Controllo della Malattia              | pag 30 |

# **Parte Sperimentale**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| 1. Scopo del Lavoro   | pag 33 |
| 2. Materiali e Metodi | pag 34 |
| 3. Risultati          | pag 38 |
| 4. Conclusioni        | pag 42 |

|                     |        |
|---------------------|--------|
| <b>Bibliografia</b> | pag 50 |
|---------------------|--------|

|                 |        |
|-----------------|--------|
| <b>Allegati</b> | pag 61 |
|-----------------|--------|

## **Introduzione**

Il virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* è un patogeno conosciuto ormai da circa vent'anni, da quando cioè, tra la fine degli anni '80 e l'inizio dei '90, l'agente eziologico è stato isolato per la prima volta presso il centro di ricerca di Lelystad, in Olanda (1991). Da allora la malattia ha cominciato ad essere studiata in modo sempre più approfondito, in quanto si è visto che i suini potevano presentare una sintomatologia differente a seconda che i soggetti colpiti fossero scrofe in gestazione (aborti e diminuzione della nati-vitalità) oppure soggetti all'ingrasso (problemi respiratori, presenza di animali di scarto) (15).

I primi studi hanno subito messo in evidenza come questo virus avesse una particolare interazione con l'ospite; infatti si è visto che esso riusciva ad eludere il sistema immunitario del suino mediante un meccanismo che, a tutt'oggi, non è del tutto chiaro.

In particolare, mediante ricerche successive si è potuto evidenziare che il virus innesca una risposta immunitaria di tipo anticorpale normale (IgM-IgG), ma la cui capacità protettiva nei confronti di una re-infezione con ceppo omologo è molto tardiva (superiore ai 2 mesi nell'infezione sperimentale), mentre è nulla nei confronti di un ceppo anche solo leggermente diverso dal punto di vista del genoma virale. Inoltre, la presenza di variazioni che possono andare dal puntiforme a delle vere e proprie modificazioni di frammenti dell'RNA sono molto frequenti sia nel ceppo tipo II (Americano) sia in quello di tipo I (Europeo) (18, 23).

Questo, unito al fatto che il controllo dell'infezione ed ancor più della malattia sono molto difficili, rende il problema particolarmente sentito in tutto il mondo.

L'utilizzo dei vaccini (sia di tipo vivo attenuato sia di tipo inattivato) non ha comportato alcun tipo di beneficio nel contenere i danni economici causati dalla PRRS; infatti

questi non hanno dimostrato di conferire nessuna protezione nei confronti di una re-infezione con isolati eterologhi rispetto a quello impiegato per allestire il vaccino (Lelystad per il vaccino utilizzato in Europa, tipo II per il vaccino utilizzato negli Stati Uniti).

La mancanza di efficacia dei presidi immunizzanti, ha portato i ricercatori impegnati nello studio di questa patologia, a focalizzare la propria attenzione sullo studio della risposta immunitaria del suino nei confronti del virus; in particolar modo, si sta ponendo molto interesse alla risposta cellulo-mediata che sembrerebbe svolgere un ruolo di primaria importanza nello sviluppo dell'infezione e successivamente della malattia.

Proprio per questi motivi, ultimamente, sia gli operatori del settore zootecnico sia i ricercatori stanno puntando molto sulle misure igienico-sanitarie e di *management* al fine di trovare una via d'uscita a questo problema (19).

L'altra strada che si sta percorrendo per meglio capire il meccanismo d'azione di questo virus, è rappresentato dall'utilizzo di singole parti del genoma virale per vedere come gli animali reagiscano in corso di infezioni sperimentali all'inoculo delle medesime da sole o in associazione con altre (16).

Quest'ultima rappresenta la via sicuramente più innovativa ed anche quella forse di maggiore interesse. Infatti, dai primi studi compiuti in proposito si è visto, che se in passato si attribuiva una grande importanza a due segmenti del genoma virale (5 e 7), l'uno più variabile e l'altro più conservato, ora l'attenzione è maggiormente rivolta verso il segmento 1 che sembrerebbe avere un impatto notevole sul tipo di interazione tra ospite e virus (3).

Per cui, se fino a qualche tempo fa il sequenziamento del genoma virale era considerato molto importante per capire il reale ruolo dei nuovi isolati di campo ed era

essenzialmente eseguito sulle regioni viste sopra, ora l'attenzione si sta spostando sulla porzione 1 e sulle sue possibili variazioni in allevamento.

Questo è particolarmente utile anche per il futuro allestimento di nuovi vaccini, che potranno essere preparati con delle singole porzioni di RNA virale, quelle cioè che si mostreranno le più efficaci nello stimolare la risposta immunitaria sia di tipo anticorpale sia di tipo cellulare.

Al momento, le prove compiute con subunità plasmidiche non hanno ancora dato i risultati sperati e, pertanto, si sta ancora lavorando in proposito.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare soggetti vaccinati contro PRRSV e mantenuti in condizioni di campo, dove potessero essere sottoposti a tutti gli *stressors* ambientali, infettivi e comportamentali che normalmente si verificano in allevamento. Tale valutazione è stata compiuta mediante analisi della risposta immunitaria (umorale e cellulo-mediata) e delle condizioni cliniche degli animali, in seguito a contatto naturale in campo con il virus PRRS.

### 1.1. Caratteristiche agente eziologico

Il virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* appartiene all'ordine *Nidovirales*, famiglia *Arteriviridae*, genere *Arterivirus*; è un RNA-virus dotato di *envelope* e dalle dimensioni di 50-65 nm di diametro, possiede un *core* nucleocapsidico di 25 nm. Il suo genoma è costituito da 7 *open reading frames* (ORFs), di cui l'ORF1 è distinto in 1a e 1b (proteine non-strutturali), questi comprendono circa l'80% del genoma virale e codificano per la replicazione dell'RNA; mentre i rimanenti sei ORFs (2, 3, 4, 5, 6, 7) codificano per le proteine strutturali del virus e, di queste le GP2, GP3, GP4 e GP5 sono N-glicosilate, mentre la proteina N del nucleocapside (ORF 7) e la proteina di matrice (ORF 6) non lo sono (21, 24).

Le tre proteine strutturali più importanti sono la GP5, la M e la N; la prima che rappresenta una delle proteine dell'*envelope*, è coinvolta nel riconoscimento del recettore e, quindi, è implicata nel processo di infezione dell'ospite; la proteina M è necessaria per l'assemblamento del virus e per l'interazione dello stesso con i recettori posti sulla cellula ospite; infine, la proteina N interagisce con l'RNA virale durante l'assemblamento delle particelle (11, 79).

Come accennato precedentemente, agli inizi degli anni '90, è stato isolato per la prima volta in Olanda presso il laboratorio di Lelystad e successivamente sono stati riconosciuti due ceppi principali: tipo I (Europeo) e tipo II (Americano), diversi non solo dal punto di vista genomico, ma anche dal punto di vista della severità della sintomatologia clinica (52).

In base ad alcuni studi di natura epidemiologica, entrambi i ceppi sembrano essersi evoluti da un progenitore comune e successivamente essersi differenziati nei due diversi continenti; la loro somiglianza genotipica si aggira tra il 55% ed il 65%.

Attualmente, si è evidenziato che il più recente progenitore comune a tutti gli isolati di PRRS risalgia al 1880 (24). Da qui, in base agli spostamenti geografici degli animali, la presenza di confini naturali, quali fiumi, catene montuose, e confini politici, nonché gli scambi commerciali tra i diversi Paesi, hanno contribuito a selezionare degli isolati di campo con caratteristiche differenti a livello genomico (67).

Per esempio, all'interno del genotipo I, oltre ad esserci la grande divisione in tre clusters principali: Lelystad, Italiano e Danese; si assiste a delle ulteriori differenze riscontrate in Europa Centrale (Polonia, Repubblica Ceca ed Ungheria) come anche in Europa dell'Est. In particolare, vi è una grande differenza genotipica degli isolati presenti in Lituania, rispetto al genotipo I; infatti a livello di lunghezza di ORF7, il PRRSV Lituano è costituito da 378 nucleotidi, una struttura intermedia tra il genotipo I (387 nucleotidi) e il genotipo II (372 nucleotidi). L'isolato Lituano sembra quello che maggiormente si avvicina al progenitore ancestrale comune di tutti gli *Arterivirus* suini (67). Inoltre, il medesimo isolato sembra avere maggiori similitudini a livello genotipico con il tipo II rispetto al I.

2002

|              | 140               | 150                      | 160 | 370                        | 380          | 390 |
|--------------|-------------------|--------------------------|-----|----------------------------|--------------|-----|
| Lelystad     | GGACAGGCCAA       | ---AAAGAAAAAGCCTG        |     | CTACATCCGCCAGTCAG          | GGTGCAAGTTAA |     |
| AuS-Lituania | . . . . . T. . .  | TAA. . . . . G. . . . C. |     | . C. . . . T. . . . . T. . |              |     |
| Vr 2332      | . . . A. . AAA. . | TAAG. . . . . . C. . G.  |     | . AT. . C. . T. AGCATGA    |              |     |

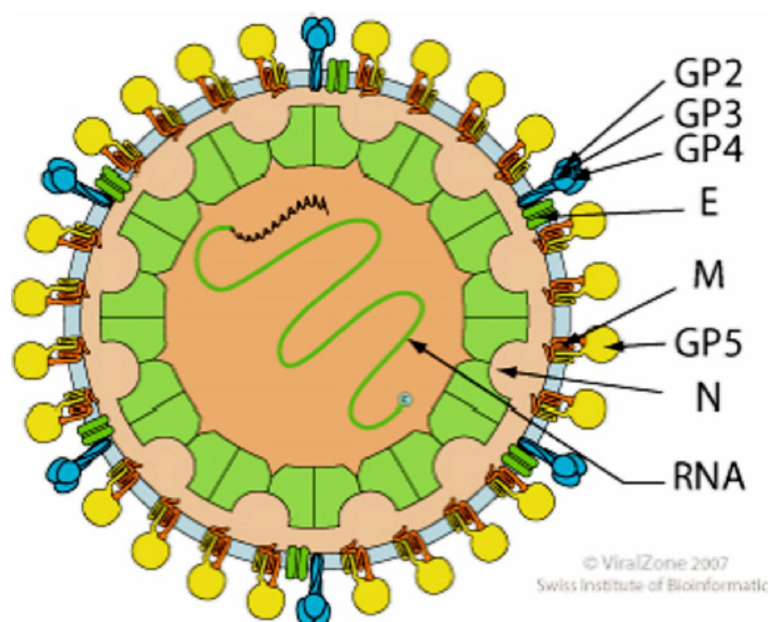
Un altro isolato è stato individuato in Bielorussia, dove è stata evidenziata una differenza molto importante a livello di ORF7 nella sequenza nucleotidica.

2006

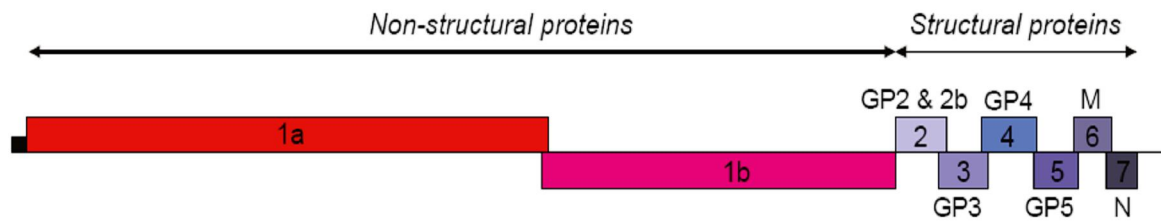
|              | 140                | 150                     | 160 | 370                      | 380          | 390 |
|--------------|--------------------|-------------------------|-----|--------------------------|--------------|-----|
| Lelystad     | GGACAGGCCAA        | ---AAAGAAAAAGCCTG       |     | CTACATCCGCCAGTCAG        | GGTGCAAGTTAA |     |
| AuS-Lituania | . . . . .T. . .    | .TAA. . . . .G. . . .C. |     | . C. . . .T. . . . .T. . |              |     |
| ZaD-Belarus  | . . . . . .G---    | . . . . . . . . . . .   |     | . C. . C .T. .T . . T. . |              |     |
| BoR-Belarus  | . . . . . .TCAC    | . . . G . . . . . . .   |     | . C. . . .T. . . . .T. . |              |     |
| Vr 2332      | . . .A. .AAA. TAAG | . . . . . .C. .G.       |     | . AT. .C. .T. AGCATGA    |              |     |

Dalla sequenza di 57 ORF7 di isolati dell'Europa dell'Est, tutti appartenenti al tipo I, si sono evidenziati tre sottotipi. All'interno del sottotipo 1, gli isolati Russi erano filogeneticamente differenti da tutti quelli degli altri Paesi.

Questa sua grande variabilità genomica conferma le difficoltà incontrate fino ad ora per comprendere la reale interazione del virus con l'ospite e la capacità di determinare una risposta immunitaria efficace.



**Fig. n. 1:** *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)*



**Fig.n. 2:** RNA PRRSV nella sua componenti proteiche: strutturali e non-strutturali

La variabilità della sequenza genomica di questo virus è molto elevata, tanto che in uno stesso allevamento possono circolare più varianti dello stesso ceppo, che per questo sono meglio definiti óisolatiô. Tale variabilità è molto importante al fine di una efficace protezione di tipo umorale, la cui presenza è molto tardiva; infatti, se da una parte le IgM e le IgG si presentano con una tempistica molto simile a quella di una normale infezione virale (intorno alla prima settimana le IgM, che poi si convertono in IgG a partire dai 10 giorni post-infezione), la capacità protettiva di questi anticorpi appare solo tardivamente (dopo il 50° giorno dall’infezione). Inoltre, data la grande possibilità di mutazioni genomiche del virus, questi stessi anticorpi non sono in grado di conferire una protezione di tipo crociato tra un isolato ed un altro (43).

Questo rappresenta anche il limite dei vaccini allestiti fino ad ora nei confronti della PRRS, siano essi di tipo vivo attenuato o di tipo inattivato; nessuno di questi vaccini è in grado di garantire una protezione nei confronti di un isolato eterologo rispetto al ceppo vaccinale (31).

### 1.2. Epidemiologia e Patogenesi

Dopo i primi isolamenti del virus, studi retrospettivi hanno dimostrato la positività sierologica in campioni ematici di suini in Canada a partire dal 1979, negli Stati Uniti

dal 1985 e nella Repubblica Democratica Tedesca dal 1987; la medesima osservazione è stata compiuta anche in Asia. Il PRRSV è altamente specie specifico, ma è stato isolato anche da: topo, ratto, cane, gatto, anatra, storno, etc. Proprio da questi dati si è cominciato a pensare che il suino non fosse l'unica specie di elezione, ma studi successivi hanno dimostrato che il virus non è in grado di replicare in animali diversi dal suino stesso (79).

L'ipotesi più comune prevede che l'Arterivirus sia saltato nella specie suina in Asia, in differenti aree a bassa densità di popolazione suina; in queste zone il virus potrebbe aver trovato delle popolazioni tolleranti, che non sviluppavano una sintomatologia particolarmente grave e quindi il microrganismo è riuscito a diversificarsi in differenti varianti. Successivamente, i cambiamenti del mercato globale, l'instaurarsi di allevamenti intensivi, con condizioni manageriali sempre più estreme e mirate per gli animali, hanno contribuito a rendere il virus più aggressivo e a determinare delle problematiche più gravi per la salute degli suini.

Con gli scambi commerciali, le razze altamente prolifiche cinesi sono state importate in Europa sin dall'ultima parte del XVII secolo, al fine di creare degli ibridi che portassero nel loro DNA anche un aumento del numero dei nati insieme alle caratteristiche che interessavano in Europa. Questo potrebbe essere stato il primo ingresso dell'Arterivirus nel Vecchio Continente, con le successive variazioni genetiche che potrebbero essere subentrare con il passare degli anni (45).

La presenza di una divisione geografica e commerciale dal secondo dopo guerra tra Europa dell'Est e dell'Ovest ha determinato lo sviluppo di due sottotipi diversi all'interno del tipo I. Una volta che vi è stata la riunificazione e sono cominciati gli scambi commerciali di prodotti e animali, i due sottotipi si sono incontrati ed hanno

dato origine ad ulteriori isolati, con altre differenze filogenetiche più o meno distanti dal prototipo iniziale (67).

Per quanto riguarda, invece, la presenza dell'Arterivirus negli Stati Uniti d'America, anche in questo caso sono state fatte delle ipotesi. Potrebbe esserci un'origine asiatica, in quanto verso la fine degli anni '80 vi sono state importazioni di animali (Meishan, Fengjing e Minzhu) in seguito ad una cooperazione internazionale tra USA e Repubblica Popolare Cinese. Inoltre, dal Canada nel 1986 sono arrivati suini acquistati in Vietnam, questi animali sono poi stati portati negli USA. In questo caso, però, sono solo delle mere ipotesi, non supportate da studi scientifici. Con l'avvento della suinicoltura moderna, la richiesta sempre più impellente di cibo per l'aumento della popolazione mondiale, ha portato alla creazione di ibridi commerciali altamente selezionati per la produzione di carne magra, con un apparato gastro-enterico molto più sviluppato rispetto all'apparato respiratorio. Tutto questo al fine di arrivare ad un suino che presentasse una grande capacità di ingestione, per avere un incremento giornaliero elevato e, quindi arrivare al peso di macellazione il più velocemente possibile (45).

Chiaramente questa situazione anatomica comporta una particolare predisposizione del suino alle patologie respiratorie, rendendo gli animali molto sensibili ai patogeni che hanno tropismo per questa parte.

Inoltre, il sovraffollamento, la presenza di polvere, le condizioni igienico-sanitarie non sempre ottimali, si sono trasformati in fattori predisponenti importanti per lo sviluppo di nuove patologie che possono essere identificate sotto il nome di malattie condizionate. La PRRS è una di queste, in quanto la concomitanza dei fattori descritti sopra e di infezioni batteriche secondarie portano allo sviluppo della malattia con sintomi di gravità variabile, fino alla morte dei soggetti.

Preso atto di questa situazione, il passo successivo è stato quello di valutare le vie di escrezione, le quali risultano essere quelle comuni: saliva, secrezioni nasali, feci, urine, seme, latte. Per cui la trasmissione da un suino ad un altro può avvenire sia in modo diretto mediante il contatto con tali secrezioni, sia tramite contatto indiretto attraverso dei vettori inanimati che possono essere rappresentati da strumenti (aghi, siringhe, etc), abiti (stivali, guanti, tute) e vettori animati (mosche, insetti) o aerosol. Una via d'ingresso particolarmente importante risulta essere quella cutanea, tramite le ferite (castrazione, morsi, graffi profondi), che comportano la trasmissione dell'infezione da un animale ad un altro in modo estremamente efficace e rapido (79, 32). Le femmine in gestazione possono trasmettere il virus ai feti e questa evenienza si traduce in una morte della nidiata oppure una diminuzione nel numero dei nati o ancora in suinetti disvitali e deboli. Il passaggio del virus avviene nell'ultimo terzo della gestazione, mentre non vi è nella prima parte della gravidanza; il meccanismo di questo processo non è ancora stato chiarito, quello che si conosce è che non va messo in correlazione con la virulenza del ceppo valutato (38, 54).

Un'altra caratteristica tipica di questo virus è la sua capacità di determinare un'infezione di tipo persistente negli animali; infatti il PRRSV è in grado di localizzarsi a livello delle amigdale e dei linfonodi anche per un tempo superiore ai 3 mesi. Questo evento è indipendente dall'età dei soggetti, infatti può coinvolgere sia animali giovani, adulti e i riproduttori. Il meccanismo in base al quale si verifica questa situazione non è ancora stato chiarito, anche se un ruolo fondamentale sembra essere giocato dal sistema immunitario che non è prontamente in grado di contrastare l'azione del virus stesso (81).

Da ultimo bisogna ricordare la capacità del microrganismo di resistere nell'ambiente

esterno, in particolar modo è stabile a temperature comprese tra -70°C/-20°C anche per anni e con pH fra 6,5/7,5; anche l'umidità è un parametro che ne favorisce la sopravvivenza. Il virus è particolarmente sensibile ai detergenti anche a basse concentrazioni, questi sono in grado di distruggere l'envelope e, quindi, di portare alla perdita della capacità infettante del microrganismo (79).

Una volta che il virus è riuscito a penetrare nell'ospite recettivo, le prime cellule ad essere colpite sono i macrofagi e, solo successivamente, i linfonodi, i polmoni e gli altri organi. Il processo mediante il quale il microrganismo entra nella cellula è quello dell'endocitosi, meccanismo che prevede l'inglobamento della particella virale all'interno di un vacuolo formato dalla membrana cellulare (endosoma); a questo punto si ha l'abbassamento del pH all'interno della struttura con fusione dell'envelope e della membrana endosomiale con la fuoriuscita del nucleocapside nel citoplasma (57). Esso, quindi replica all'interno di quei macrofagi che risultano essere maturi e capaci di svolgere la loro azione in modo completo. Inoltre, sembra che il microrganismo riesca ad infettare in modo più efficace i macrofagi di derivazione monocitaria rispetto ai monociti stessi (9).

Il virus determina una serie di lesioni a carico delle cellule dell'ospite che possono essere di varia natura ed entità; l'evento di maggiore rilievo è sicuramente l'apoptosi delle cellule infette, ma anche di quelle non infette e vicine alle prime, il che comporta anche la liberazione di citochine infiammatorie, nonché l'attivazione dei linfociti B, una diminuzione della capacità da parte dei macrofagi di portare avanti la loro attività di fagocitosi e di eliminazione dei batteri e, quindi, un aumento nella sensibilità ai fenomeni infettivi secondari (9, 57).

Tutta questa cascata di eventi comporta anche la secrezione di citochine pro-

infiammatorie da parte dei macrofagi infettati con il PRSSV, il che determina sia un richiamo di leucociti e quindi un inizio della risposta immunitaria, sia un aumento della permeabilità vascolare con conseguente edema polmonare e costrizione bronco-alveolare (57).

Gli organi bersaglio per quanto riguarda la patologia respiratoria sono i polmoni ed i linfonodi ad essi associati e, proprio questi, sono quelli sottoposti alle maggiori lesioni macro e microscopiche già dopo 7-14 giorni dall'infezione sperimentale.

Nell'ambito della problematica riproduttiva, invece, la sintomatologia principale si manifesta con: aborto, diminuzione nel numero dei nati, ipofertilità, etc.

### *1.3. Risposta Immunitaria e Sintomatologia*

Concetti di base. La risposta immunitaria dei mammiferi si divide in due comparti, una **risposta immunitaria innata o naturale** ed una **acquisita o specifica**.

L'**immunità innata** prevede le difese di base di ogni individuo, per cui si parla di barriere fisico-chimiche (cute, muco, ciglia, etc), sistema del complemento, cellule dotate di attività fagocitaria (granulociti, monociti, macrofagi, cellule dendritiche), cellule *natural killer* (NK), in possesso di attività litica nei confronti delle cellule non *self*. Queste popolazioni sono normalmente presenti nei vari soggetti e rappresentano la prima difesa dell'organismo nei confronti degli aggressori esterni; determinano una risposta estremamente rapida, anche se non specifica e non comportano la formazione di una memoria immunitaria nei confronti dei diversi antigeni che il soggetto può incontrare durante la sua vita (46, 65).

Una volta che il patogeno ha superato le prime barriere dell'ospite, entra in gioco il sistema di riconoscimento dell'immunità innata, il quale prevede l'interazione tra

recettori di membrana *Pattern Recognition Receptors* (PRR<sub>s</sub>) e i *Pathogens Associated Molecular Pattern* (PAMP<sub>s</sub>), i quali si trovano sul patogeno (lipopolisaccaridi, peptidoglicani, RNA, DNA, etc.), quindi questi sono i primi segnali di un riconoscimento antigenico che comporta l'innescamento della risposta immunitaria innata (3). Nel corso di questo primo contatto si ha la produzione sia di componenti umorali (difensine, interferoni di primo tipo e complemento) sia di componenti cellulari (fagociti, NK e linfociti T  $\alpha\beta$ ). Le difensine sono prodotte dai macrofagi, dalle cellule epiteliali e da neutrofili una volta che si ha l'attacco del patogeno, questo peptide ha una capacità microbica ed è anche in grado di promuovere la fagocitosi, facilita il reclutamento dei linfociti T *helper* CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, delle cellule dendritiche nonché dei monociti (5, 71).

L'attivazione del complemento è di fondamentale importanza per il prosieguo della risposta immunitaria, in quanto il legame tra il virus con la frazione C3b del complemento comporta l'opsonizzazione e la fagocitosi del virus.

Per quanto riguarda, invece, l'attività del sistema interferone, nel corso dell'immunità innata sono chiamati in causa quelli di tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), i quali hanno un'attività antivirale diretta (degradazione dell'RNA virale), attivano le cellule NK e sono in grado di incrementare l'attività delle cellule dell'immunità acquisita (LT citotossici).

Le altre cellule che appartengono all'immunità innata sono le NK, le quali sono attivate grazie alla presenza di citochine infiammatorie, quali: interleuchina 12 (IL-12), il *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) entrambe prodotte dai macrofagi, interleuchina 2 (IL-2) secreta dai linfociti ed IFN- $\alpha$  e  $\beta$ . Le cellule NK sono in grado di eliminare le cellule infettate dal virus; la loro citotossicità è legata a meccanismi Ca<sup>2+</sup>-dipendenti, con la produzione di perforine e l'ingresso nella cellula bersaglio di enzimi in grado di

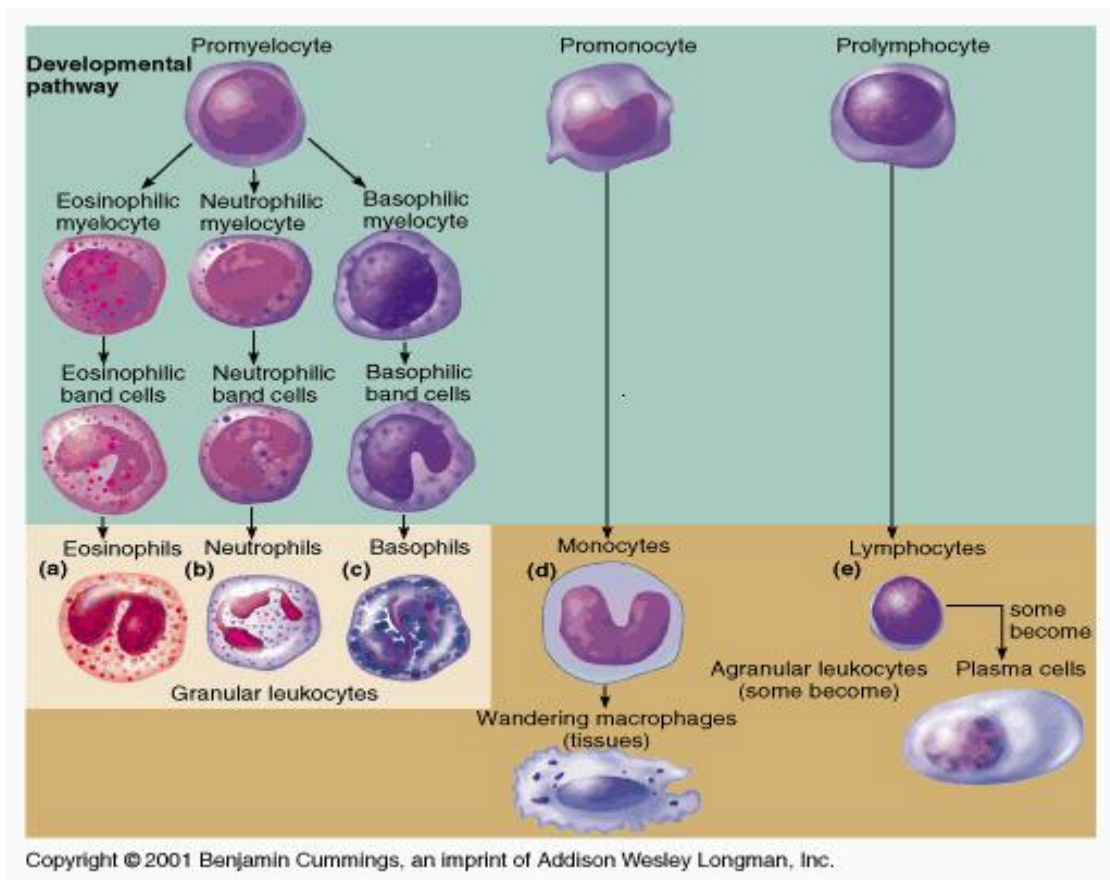
ucciderla, e  $\text{Ca}^{2+}$ -indipendenti con la produzione di citochine citotossiche (TNF  $\alpha$  e  $\gamma$ ) (5, 71).

Da ultimi, ma non meno importanti, sono i linfociti T con TCR  $\alpha\beta$  che vengono anche chiamati *null cells* o cellule doppie negative perché non esprimono i recettori di superficie CD4 e CD8, ma il cui ruolo non è ancora stato del tutto chiarito. Questa sottopopolazione linfocitaria rappresenta solo una piccola percentuale delle cellule T presenti nell'uomo e nel topo, mentre in altri mammiferi come nei ruminanti e nel suino è presente in concentrazioni superiori nel circolo ematico (71).

Il loro ruolo sembrerebbe interessare soprattutto le prime fasi dell'intero processo immunitario di tipo innato, fungendo da cellule presentanti l'antigene (APC), secernendo IFN- $\gamma$  e regolando la risposta mediata dalle IgA (71, 74).

L'immunità **acquisita**, invece, prevede la presenza di due comparti: umorale, espletata dai linfociti B che portano alla produzione di immunoglobuline (IgM, IgG, IgE, IgA) con diversi tipi di attività e quella cellulo-mediata, attuata dai linfociti T con la sintesi e secrezione di citochine atte a mediare l'attività delle diverse classi cellulari e dei processi infiammatori che si verificano in seguito ad infezioni di varia natura (51, 57, 71). La sua attivazione è più lenta, ma più duratura rispetto a quella dell'immunità innata ed è in grado di creare una popolazione di cellule memoria che conservano la capacità di rispondere prontamente nel caso di un secondo contatto con il medesimo antigene.

Il virus che penetra le difese dell'ospite, può presentarsi ai linfociti B tal quale attraverso la via ematica e/o linfatica oppure a seguito di óprocessazioneô da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC, le principali sono: cellule dendritiche, macrofagi attivati e linfociti B) ed essere messo in contatto con i linfociti T.



**Fig. 3** Schema della produzione delle cellule del sistema immunitario

A tale proposito, va ricordato che i linfociti B *naïve* sono dotati sulla loro superficie di recettori chiamati *B Cell Receptors* (BCRs), i quali vengono individuati come IgM; queste immunoglobuline sono prodotte nelle prime fasi del processo immunitario, per poi essere sostituite dalle IgG, IgA piuttosto che IgE (19, 70). Gli anticorpi bloccano l'interazione virus-ospite, impedendo la penetrazione dello stesso nella cellula bersaglio, portano alla produzione di complemento con lisi del patogeno, opsonizzazione e fagocitosi da parte dei macrofagi; inoltre, le immunoglobuline sono dotate di un'attività neutralizzante nei confronti dei virus in generale, funzione questa che, come si vedrà poi, viene meno quando si parla di PRRSV (60, 71).

L'azione dei linfociti B sembrerebbe essere controllata dai linfociti T, i quali svolgono

un ruolo di co-stimolatori nella risposta umorale; ultimamente, però, è stata riconosciuta anche una sotto-popolazione di linfociti B, indicata come B1, il cui livello di azione sembrerebbe T-indipendente (22). A questo particolare tipo di cellule, potrebbero appartenere anche quelle in grado di secernere IgA, le quali si localizzano nelle mucose e nei secreti ad esse annessi (intestino, vie aeree, lacrime, etc.); queste sono particolarmente importanti quando i microrganismi patogeni si localizzano proprio a livello dei vari apparati e funzionano come difesa dell'organismo (22, 78).

Per quanto concerne l'immunità cellulo-mediata, il ruolo preminente è svolto dai linfociti T, che si possono suddividere in:

1. Linfociti T *helper* (LTh, CD4<sup>+</sup>), i quali regolano la risposta immunitaria e che sono distinti in LTh 1 e LTh 2;
2. Linfociti T citotossici (LTc, CD8<sup>+</sup>), che hanno una funzione di distruzione delle cellule giudicate anomale dal sistema immunitarie;
3. Linfociti T soppressori (LTs), che sono in grado di spegnere il processo di difesa dell'organismo quando non vi è più aggressione da parte del patogeno o comunque quando il processo infiammatorio deve terminare.

Per quanto riguarda i linfociti T *helper*, questi hanno la funzione di cominciare la risposta di difesa nei confronti delle cellule riconosciute come non *self* e sono localizzati a livello degli organi linfoidi secondari (linfonodi, milza); come accennato in precedenza, questi, al fine di riconoscere il patogeno, hanno bisogno dell'aiuto delle APC e del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II), i quali presentano l'antigene virale al T *Cell Receptors* (TCRs) dei linfociti T *helper* che lo riconosce come anomalo e, quindi, innescano la risposta immunitaria (57, 71). Il TCR dei linfociti T è strettamente specifico, tanto che questo sarà in grado di legare solo ed

esclusivamente l'antigene verso cui è sensibile ed è formato da due catene  $\alpha$  e  $\beta$  per i linfociti T helper e citotossici e due catene  $\delta$  e  $\gamma$  per le *null cells* (5, 70).

I linfociti T *helper* riconoscono al loro interno due sottopopolazioni: LT *helper* 1 (LTh1) e LT *helper* 2 (LTh2), le quali si possono differenziare in base alle citochine che sono in grado di produrre. Gli LTh1 rispondono alle cellule dendritiche tipo I (DC1) di derivazione mieloide e sono in grado di secernere IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , la loro azione è quella di favorire la capacità citotossica dei LTC e l'attivazione dei macrofagi. Gli LTh2 rispondono alle cellule dendritiche tipo II (DC2) di origine plasmocitoide, secernono IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, questi linfociti interagiscono con il sistema dell'immunità umorale andando ad aumentare la produzione di IgG e di IgA da parte dei linfociti B (71).

Queste citochine hanno il compito di regolare la risposta immunitaria e le loro azioni sono diverse ed anche in antagonismo l'una con l'altra; infatti, spesso, la produzione di una citochina determina l'inibizione nell'azione di un'altra (2, 70). In particolare modo sembra che IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-12 siano strettamente legate l'una all'altra; per quanto riguarda IL-10, questa è stata originariamente identificata come una citochina di sintesi inibitoria, secreta dai LTh2 ad azione sulle cellule LTh1, mentre l'IL-12 è prodotta dai monociti, dai linfociti B e da altre cellule presentanti l'antigene come risposta nei confronti dell'azione di un agente microbico, inoltre sembra avere un ruolo importante nel regolare la corretta risposta da parte dei LTh1 (13).

L'IFN- $\gamma$  interferisce nella replicazione dell'RNA virale e la sua produzione avviene ad opera delle cellule NK e dai LT attivati; la sua produzione è stimolata dalla presenza in circolo di IL-12. Quindi un corretto equilibrio tra le tre componenti comporta un bilanciamento ottimale tra LTh1 e LTh2 ed anche una corretta attivazione nei confronti

della risposta virale (13). Quindi, IL-12 e IFN-...fungono come indicatori di una predominanza della risposta cellulo-mediata, mentre IL-4 è indice di una risposta umorale (13, 70).

I linfociti T citotossici *naïve* rimangono all'interno degli organi linfoidi e per venire a contatto con l'antigene, hanno bisogno che questo venga trasportato da cellule che sono identificate come cellule presentanti l'antigene (APC); una volta che il patogeno è stato processato, i peptidi derivati da tale meccanismo vengono presentati associati al complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I); in questo modo il patogeno viene portato sulla superficie cellulare ed entra in contatto con il TCR specifico che si trova sulla membrana esterna dei linfociti T citotossici che sono in grado di determinare la distruzione del virus (43). Quindi, perché i LTc vengano attivati, sono necessari tre segnali chiave: secrezione di IL-12 da parte delle cellule dendritiche, legame tra antigene e MHC I ed infine la produzione di IL-2 e IFN-...da parte dei LTh 1. In questo modo i LTc attivati danno origine a dei cloni linfocitari e si differenziano in cellule effettrici attive contro i patogeni (70).

I linfociti T citotossici attivati sono in grado di eliminare le cellule infette o, comunque, giudicate anomale tramite un processo di apoptosi che comporta l'interazione tra le due cellule con la formazione di una sinapsi immunologica nella quale vengono riversati perforine e granzimi che portano alla morte cellulare (70).

Oltre a queste popolazioni linfocitarie, esistono anche dei linfociti T deputati al controllo e allo spegnimento della risposta immunitaria, i quali sono chiamati soppressori (LTs). Tali cellule sono in grado di controllare una scorretta attivazione dei LT effettori tramite la secrezione di IL-10; come anche un corretto equilibrio tra LTh1 e LTh2 con la secrezione delle rispettive citochine; questo meccanismo è fondamentale

per stabilizzare la risposta e per andare a diminuire gradatamente nel tempo il livello dell'infiammazione. Tutto questo processo porta, in ultima analisi, al passaggio da una fase acuta ad una fase di memoria cellulare che consente all'organismo di mantenere nel proprio corredo immunitario delle popolazioni in grado di agire in modo rapido ed efficace nel caso di un secondo contatto con il medesimo agente aggressore. Tale memoria immunitaria è mantenuta sia dai linfociti B sia dai linfociti T; infatti, i primi si differenziano in plasmacellule (PC) che hanno una persistenza prolungata, mentre i secondi sono rappresentati da LT memoria che si possono identificare come cellule quiescenti fino al momento in cui vengono di nuovo in contatto con l'antigene e si differenziano in cellule effettrici e regolatrici (5, 70).

Una particolarità del suino è quella di possedere una peculiare popolazione linfocitaria identificata come LTh doppia positiva  $CD4^+$  e  $CD8^{+low}$ , che sembra svolgere un ruolo importante proprio come linfociti memoria (5).

Quindi, nel momento in cui la risposta immunitaria comincia la sua azione, si innesca tutta una serie di meccanismi che necessitano di un costante equilibrio tra le varie componenti, al fine di garantire una corretta attivazione e proseguimento delle difese dell'organismo.

Immunità in corso d'infezione da PRRSV. Quando il virus della PRRS infetta un suino, la sua prima azione è quella di cercare di eludere il sistema immunitario del suo ospite; un meccanismo efficace in tal senso è quello di determinare una bassa produzione di INF- $\gamma$  da parte delle cellule dell'immunità innata, in modo da non scatenare il segnale di pericolo che viene innescato dalla secrezione di questa citochina (43). Inoltre, la popolazione dei linfociti T  $\alpha\beta$  non viene richiamata nel sito dell'infezione, ma tende a rimanere invariata se non addirittura a diminuire sia nei polmoni sia nei linfonodi; tale

riduzione potrebbe essere causata da una bassa produzione di citochine pro-infiammatorie (IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), che impedisce una corretta attivazione della risposta cellulo-mediata (49, 76).

Nel corso di infezione sperimentale con PRRSV, a livello di risposta umorale, nel siero dei soggetti colpiti si possono individuare IgM già a partire da 5-7 giorni dopo il contatto con il microrganismo, con un picco a 14 giorni post infezione (PI), che diminuiscono gradatamente fino a scomparire al 42° giorno; le IgG sono evidenziabili dopo 7-10 giorni, con un picco intorno alle 4 settimane e rimangono costanti anche per diversi mesi (47, 48). Questi anticorpi non presentano un'attività neutralizzante, tale capacità subentra solo tardivamente, dopo i 28 giorni PI, ma anche successivamente (37, 47); la contemporanea presenza sia del virus sia degli anticorpi durante la viremia, può essere interpretata come un'incapacità da parte di questi ultimi di giocare un ruolo importante nella protezione contro il virus stesso (19). Tutto questo comporta sicuramente un vantaggio per il patogeno, soprattutto per quanto concerne la sua capacità di replicare all'interno dei macrofagi alveolari, con un fenomeno noto come *antibody-dependent enhancement* (ADE); tale meccanismo viene sfruttato da diversi agenti eziologici, i quali contano sugli anticorpi antivirali per favorire il loro ingresso nelle cellule bersaglio (78).

Una delle funzionalità più interessanti dell'infezione con PRRSV è il ritardo nello sviluppo degli anticorpi neutralizzanti (NAs). Il principale epitopo neutralizzante di PRRSV, identificato come epitopo B, è localizzato nell'ectodominio N-terminale di GP5 (aminoacido 37-44) in entrambi i ceppi, tipo I e II (50, 56). Questo epitopo neutralizzante è affiancato da siti di glicosilazione.

Un epitopo immunodominante addizionale, identificato come epitopo A, è localizzato

nell'ectodominio N-terminale di GP5 (aminoacido 27 e 31) e ha le caratteristiche di un epitopo "inganno", in modo analogo a quanto accadde nel virus dell'immunodeficienza acquisita dell'uomo (56). L'epitopo "inganno" può interferire con la risposta immunitaria all'epitopo neutralizzante principale B, in modo che risulti un ritardo nella risposta neutralizzante. L'inserzione di un epitopo pan-DR T helper fra l'epitopo B e l'epitopo "inganno" aumenta l'immunogenicità dell'epitopo B nei topi (15), suggerendo che la prossimità tra epitopo A e B sia importante nel ritardo della risposta NA.

L'epitopo "inganno" non è il solo modo mediante il quale il PRRSV può evadere la immunità umorale. La GP5, il principale bersaglio per gli NAs, contiene più di 4 siti di glicosilazione, localizzati all'interno o nelle immediate vicinanze dell'epitopo neutralizzante. I ceppi di campo americani, che mancano dei siti di glicosilazione a monte della regione iper-variabile, inducono NAs molto più rapidamente ed in modo molto più forte nei suini infetti rispetto ai ceppi che mancano del sito di glicosilazione a valle in posizione 44 (N44), anche se tutti i ceppi sono egualmente sensibili agli NAs. Come i ceppi Spagnoli si sono evoluti dal 1991 al 2005, vi è stato una tendenza a perdere il sito di glicosilazione in posizione N-46 (equivalente alla N-44 dei ceppi Americani) e a mantenere o guadagnare glicosilazioni nelle regioni affiancate (N-37 e N-53), il che è coerente con la selezione dei ceppi che inducono una scarsa risposta in NA (43).

Nei lavaggi bronco-alveolari (BAL), l'andamento degli anticorpi è il medesimo di quello sierico e ciò sta a significare che questi derivano da un'extravasazione dal torrente circolatorio; anche a questo livello vi è una capacità da parte degli anticorpi di contribuire alla *clearance* virale, ma non di eliminare il virus dai polmoni (76).

La risposta cellulo-mediata, viene evidenziata a partire da 1 settimana PI, per poi

declinare dal 20° giorno. Più in particolare, la presenza dei linfociti T si può definire come variabile e transitoria, tanto che si mettono in evidenza solo dopo il picco se non addirittura in assenza di viremia (81). Inoltre, non vi è correlazione tra la concentrazione virale e l'intensità della risposta mediata dai linfociti T sia durante il momento acuto sia durante la persistenza dell'infezione (81).

Isolati differenti di PRRSV e differenti cloni del medesimo ceppo hanno capacità diverse di indurre o inibire IFN- $\alpha$ . Risultati preliminari indicano che isolati eterologhi di PRRSV europeo hanno capacità diverse di indurre non solo IFN- $\alpha$ , ma anche TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12, nei macrofagi alveolari e cellule dendritiche. La compromissione nella secrezione di IFN- $\alpha$  potrebbe far prevedere un'influenza sullo sviluppo di un'efficace risposta immunitaria di tipo T helper 1 (Th1).

Questa destabilizzazione del sistema immunitario è ulteriormente aggravata da un'alterazione nella produzione delle citochine, che sovrintendono all'intero processo di difesa contro il virus (68, 69). In particolar modo si è potuto constatare che durante l'infezione *in vitro* ed anche *in vivo* da PRRS si ha una sovra-espressione a livello di monociti del gene che codifica per la produzione di IL-10, la quale ha un effetto di immunosoppressione sul sistema immunitario, con una conseguente drastica diminuzione della presenza dei linfociti T, ad eccezione fatta per i soli linfociti T citotossici, che tendono ad aumentare nel sangue periferico (18, 68). La stessa IL-10 è responsabile di una bassa secrezione di IFN- $\gamma$ , il quale non è, così, in grado di contrastare l'azione del virus (10); in questo complesso equilibrio, rientra anche l'IL-12, la cui principale funzione è quella di promuovere l'immunità cellulo-mediata inducendo la secrezione di IFN- $\gamma$ , e la cui espressione da parte di monociti, macrofagi e linfociti B è strettamente correlata con l'IL-10 in grado, come detto, di inibirne la sintesi (13).

Dopo vaccinazione con vaccino vivo attenuato utilizzando un ceppo Americano di PRRSV, le prime cellule secernenti IFN- $\gamma$  virus specifiche apparivano nella terza settimana post-vaccinazione, con valori altalenanti da 50 a 100 per milione di PBMC per le successive 10 settimane, con un ulteriore aumento a 400-500 per milione di PBMC a 48 settimane post-vaccinazione (44). Le cellule secernenti IFN- $\gamma$  erano prevalentemente di tipo CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, con una proporzione piccola di CD4<sup>-</sup>/CD8 $\alpha$  $\beta$ <sup>+</sup> cellule T citotossiche. Uno sviluppo ritardato simile di cellule secernenti IFN- $\gamma$  PRRSV-specifiche era evidente anche dopo infezione o vaccinazione con ceppi Europei di PRRSV (20). Al contrario, 200-300 cellule secernenti IFN- $\gamma$  per milione di PBMCs erano evidenti da 3 settimane dopo la vaccinazione contro il virus della malattia di Aujeszky (44).

Alcuni ceppi Europei di PRRSV inducono forti risposte in IL-10 nei PBMCs in suini *naïve*, che suggerisce come questo non sia una caratteristica dovuta ad una memoria immunitaria (19). Suini vaccinati con ceppi che inducono IL-1, hanno una più bassa frequenza di cellule secernenti IFN- $\gamma$ , rispetto ad animali vaccinati con un ceppo che non induce IL-10 (19).

I monociti sembrano essere la maggiore fonte di IL-10 in corso di infezione con PRRSV (10). Inoltre, PRRSV sembra indurre anche la produzione di IL-6 (66), mentre il ruolo di trasformazione del fattore di crescita  $\beta$  non è chiaro.

La stessa sovra-espressione del gene che codifica per la secrezione di IL-10 si può riscontrare anche a livello delle cellule presenti nei lavaggi bronco-alveolari (BALC); questo comportamento è sempre responsabile di immunosoppressione dei linfociti T e, infatti, si possono riscontrare essenzialmente solo linfociti T citotossici, mentre le altre componenti della popolazione linfocitaria sono praticamente assenti (69).

Nell'ambito di questa infezione va anche tenuta in considerazione l'età dei soggetti colpiti, infatti la maturità del sistema immunitario è un prerequisito essenziale per poter contrastare l'infezione. Si è potuto considerare come soggetti giovani (4 mesi di vita) presentino maggiori livelli di viremia nonché una maggiore escrezione virale rispetto a soggetti più maturi; questo potrebbe essere dovuto ad una efficacia maggiore di replicazione del virus a livello dei macrofagi (4, 53). Inoltre, si deve considerare anche una differente distribuzione delle cellule dell'immunità cellulo-mediata nei soggetti giovani rispetto a quelli adulti, soprattutto per quanto riguarda i linfonodi e i polmoni; basti pensare alla popolazione  $CD4^+$  e  $CD8^+$  che tende ad aumentare con l'età dell'animale e che rappresenta una componente importante della popolazione memoria del sistema immunitario (74).

Suineetti infettati *in utero* con *PRRSV* hanno dimostrato uno stato di immunosoppressione caratterizzato da una diminuzione della capacità di fagocitosi da parte dei macrofagi alveolari, con conseguente *deficit* immunitario dei soggetti colpiti (54, 59).

Come visto precedentemente, la produzione delle citochine da parte delle varie componenti del sistema immunitario, è di fondamentale importanza per il corretto andamento delle difese contro il virus ed è proprio su queste che si stanno concentrando molti progetti di ricerca. Infatti, è ormai noto che il *PRRSV* agisce sulle difese immunitarie dell'ospite andando ad inficiare il corretto equilibrio fra le sue varie componenti.

Sintomatologia. L'infezione da *PRRSV* può determinare una sintomatologia a carico dell'apparato respiratorio (animali dallo svezzamento alla fase di ingrasso) ed una a carico dell'apparato riproduttore (scrofe e verri in riproduzione).

Sintomatologia respiratoria. Gli animali colpiti presentano: anoressia, ipertermia, letargia, dispnea, pelo ispido e una diminuzione dell'incremento ponderale giornaliero (IPG), tutto ciò porta alla formazione di gruppi disomogenei e con animali che difficilmente riusciranno a raggiungere il peso ottimale per il macello. Inoltre, questi soggetti saranno più suscettibili alle infezioni secondarie di origine virale e batterica che circolano normalmente in allevamento. In questo caso la mortalità può variare tra il 12 ed il 20% (79).

Sintomatologia riproduttiva. Le scrofe che si infettano durante la loro carriera riproduttiva, presentano aborto nell'ultimo terzo di gravidanza, intorno ai 100 giorni di gestazione. Le scrofe che partoriscono possono presentare una nidiata di dimensioni ridotte, con suinetti disvitali, più piccoli e deboli rispetto alla norma. Gli animali possono presentare agalassia e, anche in questo caso, vi può essere una concomitanza di altre infezioni ad insorgenza secondaria. La mortalità delle scrofe può variare dall'1 al 4% durante la fase acuta della malattia (79). I verri utilizzati a scopo riproduttivo possono presentare ipertermia e oligospermia, con una netta diminuzione anche della capacità fecondante degli spermatozoi.

#### *1.4. Diagnosi*

La diagnosi in corso di infezione da PRRSV si basa su una diagnosi di sospetto in allevamento mediante il rilevamento dei sintomi e la valutazione delle lesioni anatomo-patologiche, la conferma diagnostica dal laboratorio deve ricorrere all'isolamento virale e agli accertamenti sierologici.

Diagnosi di campo. Dal punto di vista sintomatologico, il sospetto diagnostico deve essere formulato in corso di problemi respiratori in animali dallo svezzamento alla fase

däingrasso, con problemi a carico della sfera riproduttiva delle scrofe e dei verri, che si manifestano come descritto precedentemente.

Läsame anatomo-patologico sugli animali venuti a morte e/o che sono stati sacrificati non è in grado di confermare il sospetto diagnostico, perché, purtroppo, non esistono delle lesioni patognomoniche di questa malattia che ci consentano di escludere con certezza altri possibili patogeni.

Ad un primo esame dell'animale si può apprezzare un certo grado di magrezza e di disidratazione; una volta praticata la dissezione della cavità toracica ed addominale, si può valutare un'iperplasia dei linfonodi superficiali, come anche a carico dei linfonodi tracheo-bronchiali, inoltre a livello dell'apparato respiratorio si può riscontrare una polmonite interstiziale. Per quanto riguarda, invece, i feti aborti o i suinetti nati morti e/o disvitali non dimostrano alcuna lesione patognomonica che possa confermare in modo certo il sospetto diagnostico (79).

Proprio per questo motivo è necessario sottoporre gli animali ad ulteriori esami di laboratorio per riuscire a raggiungere una diagnosi di certezza.

Diagnosi di laboratorio. I campioni prelevati dagli animali sospetti sono sia campioni di sangue, sia campioni di organi, dai quali si può provare ad isolare il virus e determinare la presenza di anticorpi, per cui la diagnosi è sia diretta sia indiretta (79).

*Diagnosi diretta:* i campioni da esaminare per l'isolamento del virus ed il rilevamento dell'RNA virale vanno refrigerati ad una temperatura di 4°C ed analizzati nell'arco di 2 giorni dal campionamento. L'isolamento virale si effettua su coltura cellulare di rene fetale di scimmia MARC 145 e macrofagi alveolari di suino (MAS) (14, 17); i campioni utilizzati sono: siero ed omogenati di organi bersaglio (linfonodi, polmoni), mentre nel caso dei feti sono da preferire i campioni di soggetti in cui non è sopravvenuta la

mummificazione o comunque la macerazione, in quanto da questi ultimi non è quasi mai possibile isolare il virus; infine, nelle infezioni cosiddette *ópersistenti*, il virus è localizzato nelle amigdale e nei linfonodi (29, 81). In alternativa all'isolamento è possibile il ricorso alle reazioni di biologia molecolare, quali: *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Real-Time PCR*; la prima viene identificata come una metodica di tipo qualitativo (presenza-assenza di virus), la seconda è di tipo quantitativo (quanto virus è presente nel campione in esame). Uno svantaggio è, però, quello di non essere in grado di differenziare tra un virus con capacità infettante ed uno non-infettante (12, 79).

Il sequenziamento genico può essere utilizzato per diversi scopi: differenziare tra i virus vaccinali e quelli di campo, riuscire a monitorare la diffusione dei ceppi virali tra e all'interno delle popolazioni suine, determinare se all'interno di un allevamento vi è stata l'introduzione di un nuovo ceppo di PRRSV, etc. (12).

*Diagnosi indiretta:* la valutazione dell'avvenuta sieroconversione di un soggetto è tuttora una delle analisi diagnostiche più comunemente attuate proprio perché riuscire ad avere un campione di siero è molto semplice e non invasivo per l'animale stesso. In questo caso si deve effettuare un doppio prelievo di sangue, acuto e convalescente; un aumento del titolo degli anticorpi specifici per PRRSV mediante *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) o immunofluorescenza (IF), indica l'avvenuto contatto del soggetto con il microrganismo (42, 79). Gli anticorpi possono essere rilevati a partire dai 9 giorni *post* infezione, con un picco intorno al 30°-50° giorno con un declino fino a risultati negativi a 4-12 mesi dopo l'infezione. I risultati ELISA sono interpretati come positivi quando  $S/P$  è superiore o uguale a 0,4 e negativo quando è inferiore a 0,4 (6, 79).

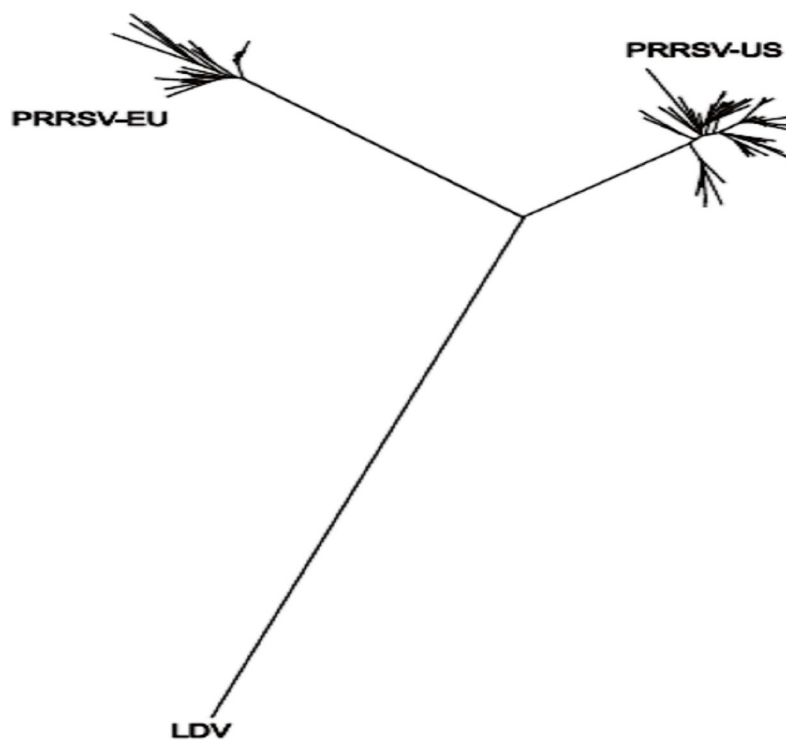
*Diagnosi immunologica:* con l'evolversi delle tecniche diagnostiche, oltre a valutare

l'immunità umorale, si è cercato di identificare anche quella cellulo-mediata, che proprio nella PRRS sembra svolgere un ruolo predominante. A tale scopo si utilizzano nuove tecniche che sono in grado di valutare quantitativamente le cellule secernenti determinati tipi di citochine coinvolte nei processi infiammatori. Nell'ambito dell'immunologia suina si può ricorrere all'*enzyme-linked immunospot assay* (ELISpot), una tecnica in grado di quantificare le cellule secernenti l'IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  ed anche alcune interleuchine (IL-4 e IL-10) (20, 34). Al medesimo scopo si può utilizzare anche la proliferazione linfocitaria, che è in grado di quantificare la produzione di citochine come IL-6, TNF- $\alpha$  etc. Tali indagini vengono eseguite sulle cellule mononucleate del sangue periferico, prelevato in provette con anticoagulante.

In questo modo si riesce a studiare in modo più completo e corretto la popolazione linfocitaria che si instaura nel momento in cui il microrganismo penetra nel suo ospite e svolge la sua azione patogenetica (62, 72).

### 1.5 Controllo della malattia

All'interno di uno stesso allevamento vi possono essere situazioni più o meno stabili, in cui il virus che circola è sempre il medesimo dal punto di vista genetico, per cui i soggetti che hanno già sierconvertito ed hanno anche anticorpi in grado di neutralizzare il virus, riescono a far fronte ad un secondo contatto di tipo omologo con l'agente patogeno e non presentano particolari problemi.



**Fig. n. 4** Albero filogenetico dei due principali ceppi di PRRSV

Altra situazione, invece è quella di quegli allevamenti, in cui a causa di eventi esterni, come ad esempio l'introduzione di nuovi animali non sottoposti a quarantena, mancati cicli di tutto pieno/tutto vuoto e relativi lavaggi/disinfezioni, è favorito l'ingresso di un nuovo isolato del virus che rappresenta un contatto di tipo eterologo. Questo fatto fa sì che il sistema immunitario degli animali coinvolti, non sia pronto ad agire in modo veloce ed efficace nei confronti del nuovo virus; per questo motivo, essi devono

affrontare una nuova infezione e, di nuovo il loro sistema immunitario si troverà impreparato ad inattivare il virus (7, 33).

Ad oggi, sono stati compiuti numerosi studi relativi all'infezione sperimentale nei confronti del virus della PRRS, ma non sempre si è stati in grado di riprodurre la malattia e questo perché sono molti i fattori ad evoluzione secondaria che possono determinare un aggravamento della sintomatologia ed eventualmente portare anche a morte l'animale. Questo è uno dei motivi per cui è particolarmente importante lo studio sul comportamento del sistema immunitario del suino nei confronti di questa infezione in campo; soprattutto, quale è la risposta immunitaria dopo che gli animali sono stati vaccinati e vengono naturalmente in contatto con il virus di campo (8, 38).

D'altro canto è necessario specificare che ciascun allevamento ha una propria storia alle spalle di gestione sanitaria e manageriale, per cui ogni azienda andrebbe valutata singolarmente; ma, si possono certamente fare delle osservazioni generali inerenti la risposta immunitaria dei soggetti analizzati e che possono rappresentare dei parametri comuni di reazione alla vaccinazione eseguita in campo (40, 41).

I vaccini normalmente impiegati non sono sufficienti a contenere i danni provocati da questa malattia; l'applicazione delle norme di biosicurezza esterna ed interna agli allevamenti (all-in all-out, lavaggi-disinfezioni, quarantena, etc.), aiutano e possono essere complementari alla vaccinazione.

In Europa non è attualmente possibile applicare quelle misure di de-popolamento/ri-popolamento che al contrario sono state attuate negli Stati Uniti, dove al contrario le grandi distanze tra un allevamento e l'altro, consentono di applicare un reale abbattimento della carica virale nell'ambiente.

Una valutazione molto importante nell'applicazione della vaccinazione va rivolta alla

risposta cellulare, in quanto quella umorale non sembra essere quella maggiormente coinvolta in questa infezione.

Tale aspetto immunitario va indagato mediante l'analisi di quelle citochine che possono svolgere un ruolo cardine nella patogenesi del virus della PRRS.

In particolar modo, le citochine infiammatorie e soprattutto Interleuchina 10 (IL-10) ed Interferone gamma (IFN- $\gamma$ ), sono quelle che rivestono il maggior interesse in proposito (39). Infatti il virus in questione avrebbe la capacità di esercitare una *down-regulation* delle cellule del sistema immunitario in grado di secernere IFN- $\gamma$  ed al contrario una *up-regulation* delle cellule secernenti IL-10. Queste due citochine, come già accennato precedentemente, hanno un ruolo fondamentale nell'ambito della risposta immunitaria: IL-10 presenta la capacità di controllare tale risposta determinando una; mentre IFN- $\gamma$  svolge la sua azione principale andando ad interferire con la replicazione del genoma virale, impedendo così la diffusione del virus all'interno dell'organismo ospite (77, 80, 81).

Vi sono anche numerose altre citochine che sono implicate nel processo di risposta cellulo-mediata nei confronti del virus della PRRS, ma le due sopracitate sembrano essere quelle più importanti e maggiormente studiate.

## Parte Sperimentale

### 1. Scopo del lavoro

Scopo di questa ricerca è stato quello di valutare mediante analisi di laboratorio la risposta di tipo immunitario di suini nei confronti di vaccinazione nei confronti del virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRSV).

In particolar modo, la ricerca è stata svolta su soggetti appartenenti ad un allevamento di tipo intensivo e, quindi, soggetti a tutte quelle componenti ambientali che possono presentarsi normalmente durante un ciclo produttivo. Inoltre, lo studio è stato svolto al fine di valutare in modo completo la risposta immunitaria stessa, per cui sia dal punto di vista umorale sia da quello cellulo-mediato nei confronti della risposta al vaccino impiegato (vivo attenuato ed inattivato e solo adiuvante) rispetto ai soggetti di controllo (placebo) dopo essere tutti venuti a contatto con il virus di campo.

Tali analisi hanno permesso di confermare che la risposta del sistema immunitario nei confronti dell'infezione con il virus della PRRS è molto complessa, in quanto il virus è in grado di ingannare le prime difese dell'organismo e di agire indisturbato sugli organi bersaglio. È necessario precisare che lo scopo precipuo del lavoro, non è stato quello di valutare l'efficacia dei vaccini presi in considerazione, ma evidenziare la risposta immunitaria innescata dalla vaccinazione e dal successivo *challenge* con infezione da virus di campo. Inoltre, la contemporanea valutazione di animali di controllo e non vaccinati o trattati con adiuvante, ha permesso di confrontare le differenti risposte al contatto con l'antigene di campo e di evidenziare come la vaccinazione non sia comunque in grado di migliorare la sintomatologia da PRRSV.

## **2. Materiali e metodi**

### 2.1 Messa a punto metodiche di laboratorio

Il primo passo è stato quello di mettere a punto le metodiche di laboratorio utilizzate per analizzare i campioni ottenuti; per fare ciò sono stati utilizzati prelievi ematici eseguiti su animali *specific pathogen free* (SPF) appartenenti al nucleo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, i cui campioni sono stati analizzati al fine di ottenere dei valori di riferimento negativi e da utilizzare come termine di paragone con i valori ottenuti dai soggetti in campo.

Tali animali SPF sono risultati negativi per quelle patologie di natura batterica e virale di più comune riscontro nella specie suina e la cui presenza avrebbe potuto interferire con le sperimentazioni effettuate.

Quindi, i campioni di sangue ottenuti sono stati trattati come descritto nei rispettivi allegati ed il materiale ottenuto è stato sottoposto alle analisi per le quali era necessario ottenere valori di riferimento (ELISpot e proliferazione linfocitaria).

### 2.2 Allevamento scelto per la prova di campo

L'allevamento scelto era situato nel Nord Italia ed era un'azienda multi-sito, dove il sito 1 era caratterizzato dalla presenza di 800 scrofe; il genotipo dei riproduttori era rappresentato da *Large White* e *Landrace* in purezza. Da questo sito provenivano i suinetti svezzati (intorno ai 30 giorni di vita) oggetto della prova e che, ogni due settimane venivano spostati in numero pari a 800 animali, nel sito due. Tale struttura aveva la capacità di ospitare 1800 soggetti dai 6 ai 35-40 Kg di p.v. e circa 6000 suini grassi dai 40 ai 165 Kg di p.v. Le strutture dello svezzamento erano costituite da capannoni suddivisi in stanze che potevano contenere 400 capi ciascuna, la pavimentazione presentava un grigliato in plastica ed i parametri climatici (temperatura,

umidità e ventilazione) erano controllati da una centralina elettronica mediante un sistema di ventilazione forzata. L'alimentazione dei soggetti era rappresentata da un alimento liquido distribuito in vasca e lasciato a disposizione dei suinetti per tutto il giorno; nel medesimo alimento venivano aggiunte sia le integrazioni in macro e micro elementi sia quelle medicamentose prescritte dal medico veterinario dell'azienda.

Per quanto riguarda, invece, la struttura dei soggetti in magronaggio/ingrasso, questa era costituita sempre da capannoni con una capienza variabile tra i 700 ed i 1200 posti, suddivisi in *box* la cui pavimentazione era rappresentata in alcuni casi da un pavimento pieno e parquetto esterno ed in altri erano dotati di pavimento fessurato in cemento senza parquetto esterno; la ventilazione era controllata mediante la presenza di finestre e cupolini che contribuivano a mantenere una temperatura costante ed un corretto tasso di umidità dell'aria. Anche in questo caso, l'alimentazione era costituita da alimento bagnato e distribuito due volte al giorno in vasca, a cui, in caso di necessità, veniva aggiunto il principio attivo farmacologico prescritto (Consorzio del Prosciutto Crudo di Parma).

Questo allevamento è stato scelto perché, in seguito a colloquio con il medico veterinario aziendale, si era evidenziata la presenza di una sintomatologia di tipo respiratorio ascrivibile a virus della PRRS a partire dalla fase di svezzamento, che si appalesava in modo conclamato nella successiva fase di magronaggio/ingrasso, con la presenza di soggetti deperiti e che non riuscivano a raggiungere il peso ottimale di macellazione (intorno ai 160 Kg).

All'esame clinico con relativa diagnosi di sospetto nei confronti di PRRSV degli animali, sono sempre seguite le conferme di laboratorio effettuate tramite prelievo di sangue ed analisi di biologia molecolare e di sierologia.

Dalle stesse era emerso che durante la fase di svezzamento, in periodi variabili tra i 50 ed i 70 giorni, i suinetti diventavano positivi nei confronti del virus della PRRS e questo determinava un elevato tasso di mortalità nonché la presenza di numerosi soggetti ódi scartoô. La presenza del virus della PRRS è stata evidenziata mediante RT-*Real Time* PCR, mentre il test ELISA è stato utilizzato per monitorare la presenza di anticorpi nel siero degli animali sottoposti alla prova.

Questi animali subivano un forte dimagrimento, con calo dell'appetito, associato ad ipertermia e disidratazione; la sintomatologia era spesso associata a forme batteriche ad evoluzione secondaria, sia di tipo respiratorio (tosse, dispnea, scolo nasale) sia di tipo enterico (feci liquide, a volte presenza di sangue).

Il trattamento con antibiotici, quali: ossitetraciclina, amoxicillina-colistina e paracetamolo non sortivano alcun effetto positivo sulla risoluzione della sintomatologia. Nella fase successiva di magronaggio/ingrasso si aveva la presenza di soggetti ódi scartoô, dove la sintomatologia era rappresentata prevalentemente da: deperimento progressivo, pallore, ipertermia e disidratazione. Anche in questo caso, la somministrazione di antibiotici non aveva dimostrato alcun miglioramento evidente nella sintomatologia.

2.3 Schema prova sperimentale. Gli animali sono stati svezzati a circa 30 giorni di vita e trasferiti dal sito 1 al sito 2, sistemati nei capannoni sopra descritti, quindi sono stati suddivisi in 4 gruppi di 10 animali ciascuno e sottoposti a visita clinica (esame obiettivo generale).

Quindi, dopo un periodo di acclimatemento di 10 giorni, in cui hanno avuto il tempo di abituarsi al nuovo ambiente, alla nuova alimentazione, etc, sono stati nuovamente controllati dal punto di vista clinico, al fine di verificare che non vi fossero problemi di

carattere sanitario che potessero influenzare la prova.

Quindi, i quattro gruppi scelti sono stati trattati come segue:

- gruppo 1: iniezione intramuscolare di  $10^{4,5}$  di vaccino vivo attenuato del commercio basato sul ceppo Lelystad di PRRSV, diluito in 2 ml di adiuvante (Ůtocoferolo acetato)
- gruppo 2: iniezione intramuscolare di 2 ml di adiuvante (Ůtocoferolo acetato) del vaccino vivo attenuato per PRRSV visto sopra
- gruppo 3: iniezione intramuscolare di 2 ml di vaccino inattivato per PRRSV del commercio
- gruppo 4: iniezione intramuscolare di 2 ml di soluzione sterile apirogena (animali di controllo)

La prova è stata eseguita nell'ambito di 120 giorni, con prelievi a cadenza mensile dal primo intervento vaccinale; inoltre, sono stati eseguiti 2 prelievi aggiuntivi a 7 e 14 giorni rispettivamente, al fine di verificare l'effettiva viremia degli animali (vaccinazione/infezione)

Mentre veniva eseguito il trattamento immunizzante, sono stati prelevati anche i due campioni di sangue (provetta con e senza litio-eparina) per le analisi da eseguire in laboratorio e che rappresentavano il T0 dalla vaccinazione. Inoltre, gli animali sono stati osservati per valutare eventuali problemi di natura clinica.

L'analisi statistica dei risultati relativi all'immunità umorale (anticorpi) e della secrezione di citochine è stata compiuta mediante il test del Chi-quadro. Il test dell'espressione genica, valori del  $\Delta\text{Ct}$  in presenza di PRRSV e controllo, rispettivamente, sono stati analizzati mediante il  $t$  test (Prism 2.01, GraphPad Software, San Diego, CA). La significatività è stata fissata  $p < 0.05$ .

### 3. Risultati

Al fine di metter a punto le metodiche per una corretta valutazione dell'immunità cellulo-mediata, è stato deciso di prelevare dei campioni di sangue da 15 suini SPF. Tali analisi hanno permesso di compiere una serie di prove per una prima determinazione dei valori relativi a cellule secernenti IFN-...e blastizzazione linfocitaria. Questo è stato possibile confrontando i campioni in presenza/assenza di uno mitogeno, quale la concanavalina-A (Con-A). In questo modo si è evidenziata la risposta di un soggetto sano e si è mimata la possibile presenza di uno stimolo antigenico.

Un ulteriore importante raffronto è stato effettuato tra il T0 che rappresentava il momento in cui gli animali arrivavano in allevamento ed erano ancora negativi nei confronti dell'infezione di campo ed i tempi successivi, fino al T120, che rappresenta il termine del lavoro.

3.1. Osservazioni cliniche. Tutti gli animali appartenenti ai quattro gruppi in esame hanno presentato una sintomatologia di tipo respiratorio: tosse, starnuti, dispnea, associata ad ipertermia e depressione del sensorio. Nel gruppo 2 ( animali trattati solo con adiuvante) nessun soggetto è morto, mentre nei gruppi 1 (vaccino vivo attenuato), gruppo 3 (vaccino inattivato) e 4 (controllo) vi sono stati 3, 2 e 2 soggetti morti, rispettivamente. Sulla base delle evidenze cliniche, non vi è stata alcuna dimostrazione di un miglioramento nella sintomatologia nei due gruppi sottoposti a vaccinazione.

L'esame necroscopico dei soggetti morti durante la prova ha messo in luce la presenza di polmonite interstiziale, presenza di polmonite apicale (*M. hyopneumoniae*), iperplasia dei linfonodi inguinali, dimagrimento.

3.2 Osservazioni di laboratorio. Tutti i campioni biologici ottenuti dai singoli prelievi di sangue degli animali, sono stati analizzati per la valutazione dei diversi parametri

diagnostici presi in considerazione.

Il siero ha permesso di valutare la presenza di RNA compatibile con il virus della PRRS in tutti gli animali della prova; mediante l'analisi del sequenziamento genico si è potuta osservare una differenza moderata (11,1% in ORF7) tra l'isolato di campo ed il Genotipo I (Tab. 1 e 2).

**Tabella 1. Viremia valutata mediante RT-Real Time PCR (siero)**

| <i>Gruppo</i>                      | <b>PVD 0</b> | <b>PVD 14</b> | <b>PVD 30</b> | <b>PVD 60</b> | <b>PVD 90</b> | <b>PVD 120</b> |
|------------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>1. Vaccino PRRS Attenuato</b>   | Neg          | Pos           | Pos           | Pos 5/10      | Neg           | Neg            |
| <b>2. Adjuvante</b>                | Neg          | Pos           | Pos           | Pos           | Neg           | Neg            |
| <b>3. Vaccino PRRSV Inattivato</b> | Neg          | Neg           | Neg           | Pos           | Neg           | Neg            |
| <b>4. Non Vaccinato</b>            | Neg          | Neg           | Neg           | Pos           | Neg           | Neg            |

**Tabella 2. Sequenziamento PRRSV isolato dal siero degli animali**

***ORF7 sequence***

5ö ñ  
 ATGGCCGGTAAGAACCAGAGCCAGAAGAGAAATAAGAACACAGCTCTAATG  
 GGGAATGGCCAGTCAGTCAATCAACTGTGCCAGTTGCTGGGTACAATGATGA  
 AATCCCAGCGTCAGCGATCCAGGGGAGGACAGGCCAAAAAGAAGAAGCCT  
 GAGAAGCCGCATTTTCCCCTGGCTGCTGAAGATGACGTCCGGGCATCACCTCA  
 CCCAAACCGAACGCTCCCTTTGCCTGCAATCGATCCAGACGGCCTTTAATCA  
 AGGTGCAGGAATTGCGTCGCTTTCATCCAGTGGGAAGGTCGGTTTCCAGGTT  
 GAGTTCATGTTGCCGGTCGCTCATA CGGTGCGCCTGATCCGTGTGACTTCCAC  
 ATCCGCCAACCAAGGATGCTAATTAA - 3ö

*La sequenza sopra descritta (11.1% divergenza nucleotidica dal ceppo vaccinale Lelystad PRRSV) è stata dimostrata in tutti i soggetti dei 5 gruppi.*

Inoltre, la presenza di anticorpi (IgG) specifici nei confronti di questa infezione, sono stati evidenziati a partire da 14 giorni dopo l'inizio della prova (vaccinazione) fino alla

fine delle osservazioni. I livelli sono risultati significativamente superiori nel gruppo 1 ( $P < 0,001$ ) rispetto agli altri; molto probabilmente vi è stata una doppia stimolazione, determinata prima dal vaccino e successivamente dal contatto con l'isolato di campo, infatti gli animali risultavano viremici nonostante la presenza di IgG (Tab. 3).

**Tabella 3. Anticorpi IgG nel siero degli animali**

| <i>Gruppo</i>                     | <b>PVD 0</b> | <b>PVD 14</b> | <b>PVD 30</b> | <b>PVD 60</b> | <b>PVD 90</b> | <b>PVD 120</b> |
|-----------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>1. Vaccino PRRS attenuato</b>  | 0/10         | 5/10          | 9/10          | 10/10         | 10/9          | 7/7            |
| <b>2. Adjuvant</b>                | 0/10         | 1/10          | 1/10          | 10/10         | 10/10         | 9/10           |
| <b>3. Vaccino PRRS inattivato</b> | 0/10         | 0/10          | 0/10          | 9/10          | 10/8          | 8/8            |
| <b>4. Non vaccinato</b>           | 0/10         | 0/10          | 0/10          | 10/10         | 10/10         | 7/8            |

L'attività neutralizzante di questi anticorpi è stata valutata in laboratorio ed il risultato ha evidenziato che i soggetti di controllo (gruppo 4), hanno sviluppato una risposta verso il virus intorno alla fine della prova (dopo 60 giorni); al contrario, la risposta negli altri gruppi è cominciata prima, intorno al 30° giorno, per completarsi al 60° giorno. Tale risposta è rimasta costante fino alla fine delle osservazioni, T120 (Tab. 4).

In particolare, una risposta neutralizzante generalizzata sembra essere ben evidente nel gruppo 1, al contrario di quanto avviene negli altri gruppi al giorno 30 ( $P < 0,06$ ), tale valore conferma lo stato di conservazione del vaccino attenuato utilizzato per la prova.

**Tabella 4. Anticorpi (IgG) con attività neutralizzante contro PRRSV (siero)**

| <i>Gruppo</i>                     | <b>PVD 0</b> | <b>PVD 30</b> | <b>PVD 60</b> | <b>PVD 90</b> | <b>PVD 120</b> |
|-----------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>1. Vaccino PRRS attenuato</b>  | 0/10         | 3/10          | 9/10          | 8/9           | 7/7            |
| <b>2. Adjuvant</b>                | 0/10         | 1/10          | 4/9           | 7/10          | 10/10          |
| <b>3. Vaccino PRRS inattivato</b> | 0/10         | 0/10          | 3/10          | 6/8           | 8/8            |
| <b>4. Non vaccinato</b>           | 0/10         | 0/10          | 0/9           | 5/10          | 9/9            |

La valutazione dell'immunità cellulo-mediata, ha messo in luce alcuni aspetti interessanti. Infatti, la valutazione mediante metodica ELISA di IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$

nel plasma di tutti gli animali ha evidenziato una risposta molto debole al T60 per le citochine prese in considerazione in tutti i gruppi. Al T14, è stata evidenziata una risposta in IFN- $\gamma$  di tipo aspecifico, con valori medi superiori a 20 mOD in tutti i gruppi (non tutti i soggetti responsivi), mentre successivamente tale risposta è risultata debole nei confronti di PRRSV. Per quanto riguarda i livelli di IL-10, questa ha messo in luce sia nei soggetti vaccinati sia in quelli di controllo dei valori elevati al T14 e T30 (60-100 pg/ml), che si abbassavano nei prelievi successivi (30-40 ng/ml). Le differenze, però, non erano significative tra i differenti gruppi. La stessa situazione si è verificata nella valutazione della proliferazione linfocitaria per tutti i gruppi, con valori che evidenziavano una mancata attivazione della risposta cellulo-mediata (Tab. 5). La valutazione delle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs), ha permesso di evidenziare la presenza di cellule secernenti IFN- $\gamma$  (SC IFN- $\gamma$ ), specifiche nei confronti del virus della PRRS. I valori al T0 sono stati considerati come livelli basali (30 SC IFN- $\gamma$ /10<sup>6</sup> PBMCs) ed hanno rappresentato il cut-off a cui fare riferimento per le successive valutazioni. I soggetti hanno mostrato di rispondere in modo abbastanza anomalo allo stimolo *in vitro* al PRRSV utilizzato per la prova (Lelystad virus ed isolato di campo); infatti la risposta nei confronti del virus vaccinale era superiore rispetto a quella evidenziata dal virus di campo al T30 (120 vs 90 SC IFN- $\gamma$ /10<sup>6</sup> PBMCs), nei soggetti del gruppo 1, mentre i valori si sono attestati su livelli simili per gli altri 3 gruppi (100 SC IFN- $\gamma$ /10<sup>6</sup> PBMCs). Tali differenze, però, non erano significative. Nel prosieguo delle osservazioni, i livelli di SC IFN- $\gamma$  hanno mostrato un andamento altalenante, in presenza di soggetti più o meno responsivi all'interno del medesimo gruppo. Questi confermano come la risposta immunitaria ed in particolar modo quella cellulare, sia una risposta molto individuale in corso di infezione con il virus della

PRRS; e come sia molto difficile poter fornire dei parametri di riferimento di popolazione per stabilire come si comporti il sistema immunitario contro questo virus.

**Tabella 5. Risposta cellulo-mediata virus della PRRS al PVD 60**

| <i>Gruppo</i>                     | <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | <b>LST</b> | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | <b>IL-10</b> |
|-----------------------------------|--------------------------------|------------|--------------------------------|--------------|
| <b>1. Vaccino PRRSV attenuato</b> | 0/10                           | 0/10       | 4/10                           | 2/10         |
| <b>2. Adjuvant</b>                | 0/10                           | 0/10       | 0/10                           | 2/10         |
| <b>3. Vaccino inattivato</b>      | 1/10                           | 1/10       | 2/10                           | 1/10         |
| <b>4. Non vaccinato</b>           | 1/10                           | 1/10       | 2/10                           | 2/10         |

**Tabella 6. Espressione dei geni delle citochine in leucociti suini in coltura al PVD60**

| <b>Citochine</b> |                                |                   |                                |                   |                                |                    |
|------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------|
|                  | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> |                   | <b>IL-1<math>\beta</math></b>  |                   | <b>IFN-<math>\gamma</math></b> |                    |
|                  | <b>PRRSV</b>                   | <b>Mock virus</b> | <b>PRRSV</b>                   | <b>Mock virus</b> | <b>PRRSV</b>                   | <b>Mock virus</b>  |
| <b>Gruppo 1</b>  | 12.18 $\pm$ 0.556              | 12.07 $\pm$ 1.004 | 7.422 $\pm$ 4.089              | 9.230 $\pm$ 3.683 | 15.720 $\pm$ 1.585             | 15.650 $\pm$ 1.282 |
| <b>Gruppo 2</b>  | 12.11 $\pm$ 1.499              | 13.35 $\pm$ 0.622 | 7.436 $\pm$ 3.847 <sup>A</sup> | 2.160 $\pm$ 3.629 | 15.500 $\pm$ 1.580             | 15.550 $\pm$ 1.300 |
| <b>Gruppo 3</b>  | 11.32 $\pm$ 0.974              | 10.76 $\pm$ 2.229 | 9.612 $\pm$ 1.283              | 7.203 $\pm$ 1.717 | 14.789 $\pm$ 1.600             | 15.700 $\pm$ 1.350 |
| <b>Gruppo 4</b>  | 11.13 $\pm$ 1.881<br>*         | 8.723 $\pm$ 0.559 | 7.131 $\pm$ 2.474              | 6.185 $\pm$ 1.893 | 15.150 $\pm$ 1.620             | 14.980 $\pm$ 1.290 |

Inoltre, è stato valutata anche la presenza di geni in grado di esprimere determinate citochine, nei leucociti in coltura al T60. L'espressione di geni per TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  è stata determinata mediante metodica di RT-*Real Time* PCR in sangue intero stimolato sia con virus della PRRS sia con criolisato di MARC-145, considerato come *mock antigen*. In questo caso, è stato evidenziato come l'espressione del gene per TNF- $\alpha$  sia stata significativamente sotto-regolata ( $P < 0.05$ ) nel gruppo 4 rispetto agli altri; il gene per IL-1 $\beta$  sia significativamente sotto-regolato negli animali del gruppo 3 e nel gruppo 2. Al contrario, non sono state evidenziate differenze significative per quanto riguarda l'IFN- $\gamma$  (Tab. 6).

#### 4. Conclusioni

Come già accennato in precedenza, questo studio è stato affrontato al fine di investigare

la risposta immunitaria in soggetti vaccinati e non in condizioni di campo. La mancanza di informazioni univoche e certe nei confronti del virus della PRRS, comporta la necessità di analizzare parametri che normalmente non sono presi in considerazione in un routinario approccio di tipo diagnostico.

Per tali motivi, questa prova ha previsto di dare un risalto particolare alle analisi atte a valutare la risposta immunitaria e, in particolar modo, la risposta cellulo-mediata.

Il lavoro, quindi, non è stato improntato per stimare l'efficacia dei vaccini utilizzati nella prova, ma per determinare le eventuali differenze a livello di risposta immunitaria tra suini sottoposti a vaccinazione e naïve che si sono infettati in condizioni di campo. Infatti, le prove compiute tramite le prove sperimentali sono molto utili, in quanto riescono ad evidenziare lo sviluppo dell'infezione e l'evoluzione della sintomatologia, ma non sono mai sovrapponibili a ciò che avviene realmente in campo. Questo è particolarmente importante nel caso della PRRS, dove il *management* e le possibili infezioni secondarie giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della malattia.

Il lavoro compiuto sui soggetti SPF ha permesso sia di mettere a punto le metodiche utilizzate nello studio, sia di fornire dei valori di riferimento (*cut-off*) per le successive analisi compiute sui soggetti della prova in campo.

La scelta dell'allevamento da monitorare ha permesso di valutare effettivamente degli animali che, arrivati negativi in azienda, si sono infettati naturalmente con il virus della PRRS e si sono verificate le normali condizioni di vita a cui sono sottoposti gli animali durante il loro ciclo produttivo. In queste vi erano comprese le manualità sia di tipo manageriale sia di tipo medico (vaccinazioni, terapie parenterali), tutti eventi che possono intervenire in modo più o meno negativo sullo stato di salute dei soggetti.

Il lavoro nel suo insieme ha permesso una valutazione clinica e dello stato immunitario

degli animali, con lo scopo di evidenziare la risposta al virus preso in considerazione.

La sintomatologia clinica apprezzata in questo allevamento è sostanzialmente simile a quella comunemente osservata in campo; da questo punto di vista è corretto sottolineare che gli animali appartenenti al gruppo 1 (vaccino vivo attenuato), non hanno mostrato alcuna protezione nei confronti della malattia. Inoltre, 1 animale del gruppo 3 (vaccino inattivato), è rimasto sierologicamente negativo anche al giorno 60 post vaccinazione e questo potrebbe significare che vi è stata una tempistica differente nel momento di infezione tra i 3 gruppi.

La presenza di anticorpi non-neutralizzanti tra il PVD 0 e 30 è dovuto alla presenza di viremia in seguito a vaccinazione nel gruppo 1, questo è confermato anche da uno studio precedente che metteva in luce la replicazione virale nei macrofagi alveolari mediata da anticorpi contro PRRSV non dotati di attività neutralizzante (77). Inoltre, la medesima affermazione è possibile anche per gli animali appartenenti al gruppo 2, in seguito a stimolazione con l'adjuvante.

Per quanto riguarda la valutazione della viremia mediante il test della PCR, il fatto di aver preferito una metodica di tipo qualitativo e non quantitativo, è dettato dalla grande variabilità delle risposte individuali nei confronti dell'infezione e dalla discrepanza tra la protezione clinica e virologica nei suini infetti da PRRSV.

La presenza di una forte risposta neutralizzante negli animali sottoposti alla vaccinazione con virus attenuato (gruppo 1) è stata correlata con una clearance virale al DPV 60 nel secondo gruppo. Sebbene, la risposta neutralizzante dovrebbe essere valutata con una certa cautela, a causa della divergenza nucleotidica tra il vaccino e l'isolato di campo (11,1% in ORF7). Come risulta, l'attività neutralizzante dei sieri contro il ceppo di Lelystad predisposta in vitro potrebbe essere inferiore rispetto

all'isolato eterologo di campo. D'altro canto, questi dati sottolineano la necessità di perfezionare un test di sieroneutralizzante più efficiente e nel quale sarebbe opportuno prendere in considerazione la possibilità di utilizzare 3-4 isolati di PRRSV differenti, con una divergenza nucleotidica definita nonché una sequenza di glicosilazione in GP5 nota.

Questo tipo di test potrebbe essere particolarmente utile al fine di valutare in un modo migliore l'effettiva capacità di protezione nei confronti degli isolati circolanti in allevamento e per una migliore pianificazione dei programmi di controllo verso la malattia.

I tests applicati al fine di valutare in vitro la risposta dell'immunità cellulare, sono stati eseguiti con il ceppo vaccinale della PRRSV e con l'isolato di campo, e questo potrebbe essere importante alla luce delle differenze genomiche mostrate dai differenti isolati. I risultati evidenziati in questo studio sono in accordo con la scarsa risposta in cellule secernenti IFN- $\gamma$  (ELISpot) di suini infetti con PRRSV riportati anche in altri lavori (1, 36, 75) e la contemporanea presenza all'inizio dell'infezione/vaccinazione di IL-10. Questo confermerebbe come non vi sia una effettiva capacità da parte del sistema immunitario cellulare di rispondere in modo corretto al virus anche se precedentemente stimolato con un vaccino vivo attenuato. In questo lavoro sono stati impiegati solo due ceppi di PRRSV, ma studi effettuati in Spagna hanno dimostrato che differenti isolati sono in grado di stimolare in modo più o meno intenso il sistema immunitario (comunicazione personale). Questo tipo di azione è evidenziata *in vitro* su macrofagi alveolari e su MARC-145, dopo contatto con isolati di PRRSV diversi dal punto di vista genomico e che sono in grado di determinare una risposta a livello citochinico più o meno marcata in IFN- $\gamma$  ed IL-10 (1).

Proprio per questo motivo, è stato deciso di indagare anche *in vitro* l'espressione dei geni ed il conseguente rilascio di citochine coinvolte nelle funzioni di tipo immunoregolatorie ed effettrici come sistema reporter nelle modificazioni guidate dal virus della PRRS nei confronti del sistema immunitario del suino, come anche di possibili funzioni regolatorie da parte del vaccino. La scelta di andare ad investigare in modo specifico IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  è stata dettata dal loro riconosciuto ruolo di immuno-modulatori sia *in vitro* sia *in vivo* in corso di infezione con PRRSV evidenziato anche in studi precedenti (63, 41, 43). La valutazione della presenza di cellule secernenti IFN- $\gamma$  rimane una risposta molto individuale e correlata al tipo di isolato coinvolto nell'infezione; per questo motivo non è sempre attendibile, anche se rappresenta comunque un riferimento importante soprattutto nell'ambito delle infezioni sperimentali, dove si conoscono in modo preciso sia i tempi in cui si effettua l'infezione sia le caratteristiche del virus impiegato per tale pratica. In campo, invece, dove le variabili che entrano in gioco sono molteplici, può essere utile, ma non di fondamentale importanza. Inoltre, la mancanza di correlazione tra la presenza di cellule secernenti IFN- $\gamma$  e livelli della medesima citochina a livello sierico, non consentono di mettere in relazione i due parametri. Nel caso specifico di questo studio, la mancanza di una risposta in IFN- $\gamma$  al PVD 60 potrebbe rappresentare un bilanciamento nei confronti della risposta particolarmente elevata in anticorpi neutralizzanti dimostrata negli animali del gruppo 1, quindi, verso il ceppo vaccinale; seguita, poi dalla presenza di una viremia da infezione di campo.

Questa prima valutazione potrebbe essere un'ulteriore dimostrazione che alcuni isolati di PRRSV possono oltrepassare l'immunità indotta dai vaccini attualmente in commercio, senza che il suino immunizzato riesca a porre una valida barriera alle

infezioni di campo.

Per questo motivo, sarebbe preferibile una valutazione non solo dell'immunità umorale, ma anche di quella cellulare, con particolare riferimento alle citochine sopra menzionate; in modo tale da fornire una valutazione completa del sistema immunitario del soggetto infettato.

Riguardo a questi parametri, è bene sottolineare che gli animali del gruppo 1 hanno mostrato una prevalenza maggiore nelle singole risposte in TNF- $\alpha$  al GPV 60, rispetto agli altri gruppi.; come anche il gene per IL-1 $\beta$  è stato evidenziato come significativamente sotto-regolato nei leucociti analizzati *in vitro*, negli animali del gruppo 3 in presenza di PRRSV. Questi risultati sottolineano il differente impatto del vaccino vivo attenuato rispetto al vaccino inattivato e come vi sia una selezione preferenziale delle diverse cellule secernenti citochine negli animali vaccinati.

In conclusione, lo studio svolto ha messo in luce alcuni aspetti che potrebbero essere così riassunti:

- La risposta immunitaria dei soggetti coinvolti nella prova ha evidenziato che sia gli animali vaccinati sia quelli di controllo hanno un'alterazione a livello cellulo-mediato, con una mancata attivazione del corretto circuito citochinico (IFN- $\gamma$ , IL-10) e quindi di tutte quelle reazioni a cascata che dovrebbero consentire all'ospite di contrastare l'agente virale.
- La precoce risposta anticorpale negli animali vaccinati non è protettiva (77). Questo sottolinea la necessità di un'immunizzazione precoce dei soggetti contro il virus della PRRS; tale intervento dovrebbe essere riservato solo agli animali che risultano privi di anticorpi specifici contro il virus e prima che entrino nella

fase in cui si potrebbe verificare l'infezione con l'isolato di campo.

Questo rappresenta sicuramente uno dei punti cruciali per lo sviluppo di un corretto piano vaccinale e delle successive misure di controllo nei confronti prima dell'infezione e successivamente della malattia.

- Per quanto riguarda i parametri per una valutazione di tipo predittivo della protezione, entrambi i vaccini utilizzati nello studio non hanno dimostrato di indurre una risposta in IFN- $\gamma$  virus specifica nei primi due mesi dopo la vaccinazione. Al contrario, il vaccino allestito con virus vivo attenuato potrebbe determinare la presenza duratura nel tempo di anticorpi neutralizzanti nei confronti del ceppo vaccinale, evento che non si verifica nel caso dell'utilizzo di vaccino inattivato.
- La presenza di anticorpi neutralizzanti non esprime l'effettiva capacità protettiva dell'immunità umorale nei confronti di isolati differenti dal punto di vista genomico al ceppo di Lelystad.

La *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* rimane una malattia con ancora numerosi punti oscuri che necessitano di ulteriori studi per poter giungere a delle conclusioni certe e che consentano di avere informazioni utili su come riuscire a controllarla in modo efficace.

Il numero di questioni non ancora risolte nell'ambito delle conoscenze sulla PRRS sono ancora numerose. Per esempio, lo sviluppo di una risposta immunitaria adattativa dopo infezione con PRRSV o vaccinazione è anomala. Le cellule secernenti IFN- $\gamma$  appare tardivamente ed evolve in modo anomalo durante le prime settimane dopo l'infezione; le risposte NA sono anch'esse ritardate. Gli NAs possono proteggere contro la malattia se presente in quantità sufficiente prima dell'infezione, ma essi non sembrano essere

essenziali per eliminare il virus dal sangue durante il corso dell'infezione. Il PRRSV è in grado di modulare le risposte innate, probabilmente attraverso la regolazione delle risposte in IFN- $\alpha$  e di IL-10. Esistono due genotipi differenti di PRRSV che si sono evoluti in parallelo. La protezione crociata conferita da ciascun genotipo è solo parziale e la diversità genetica all'interno di ciascun genotipo può essere alta abbastanza da consentire un animale vaccinato di essere re-infettato da un differente ceppo con il medesimo genotipo. Queste circostanze creano difficoltà nella comprensione di come il sistema immunitario ed il virus interagiscano tra di loro.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Ait-Ali T., Wilson A.D., Westcott D.G., Clapperton M., Waterfall M., Mellencamp M.A., Drew T.W., Bishop S.C., Archibald A.L.** 2007, óInnate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophagesô, *Viral Immunol.* **20**(1):105-18
2. **Amadori M., Cristiano A., Ferrari M.** 2010 óConstitutive expression of interferon in swine leukocytesô *Res Vet Sci.* **88**(1):64-71
3. **Beura L.K., Sarkar S.N., Kwon B., Subramaniam S., Jones C., Pattnaik A.K., Osorio F.A.** 2010 óPorcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activationô *J. Virol.* **84**, 1574-1584.
4. **Bianchi A.T.J., Scholten J.W., Moonen Leusen B.H.W.M., Boersma W.J.A.** 1999 óDevelopment of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pigs as a function of organ, age and housingô *Devel. & Comp. Immun.* **23**: 511-520
5. **Borghetti P.** 2005 óCell-mediated immunity and viral infection in pigô *PRRS Fact vs Speculation Proceedings* 9-27
6. **Brown E., Lawson S., Welbon C., gnanandarajah J., Li J., Murtaugh M.P., nelson E.A., Molina R.M., Zimmerman J.J., Rowland R.R.R., fang Y.** 2009 óAntibody response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and IIô *Clin. Vac. Immunol.* **16**, (5): 628-635
7. **Chang C.C., Yoon K.J., Zimmerman J.J., Harmon K.M., Dixon P.M., Dvorak C.M.T., Murtaugh M.P.** 2002 óEvolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus during sequential passages in pigsô *J. Virol.* **76**: 4750-4763

8. **Charerntantanakul W.** 2009 óAdjuvants for Porcine Reproductive and Respiratory Synrome Virus vaccinesô Vet. Imm. Immunopath. **129**: 1-13
9. **Charerntantanakul W., Platt R., Johnson W., Roof M., Vaughn E., Roth J.A.** 2006 óImmune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virusô Vet. Imm. Immunopath. **109**: 99-115
10. **Charerntantanakul W., Platt R., Roth J.A.** 2006 óEffects of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-infected antigen presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine productionô Viral. Immun. **19**: 646-661
11. **Cho J.G., Scott A.D.** 2006 óPorcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virusô Ther. **66**: 655-662
12. **Christopher-Hennings J., Faaberg K.S., Murtaugh M.P., Nelson E.A., Roof M.B., Vaughn E.M., Yoon K.J., Zimmerman J.** 2002 óPorcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) diagnostics: interpretation and limitationsô J. Swine Health Prod. **10** (5): 213-218
13. **Chung H.K., Chae C.** 2003 óExpression of interleukin-10 and interleukin-12 in piglets experimentally infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)ô J. Comp. Pathol. **129**: 205-212
14. **Costers S., Lefebvre D.J., Delputte P.L., Nauwynck H.J.** 2008 óPorcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophagesô Arch. Virol. **153** (8): 1453-65
15. **Darwich L., Díaz I., Mateu E.** 2010 óCertains, doubts and hypothesis in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunologyô Virus Res., doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.017

16. **De Lima M., Kwon B., Ansari I.H., Pattnaik A.K., Flores E.F., Osorio F.A.** 2008  
Development of a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus differentiable (DIVA) strain through deletion of specific immunodominant epitopes Vaccine **26** (29-30): 3594-600
17. **Delrue I., Van Gorp H., Van Doorselaere J., Delputte P.L., Nauwynck H.J.** 2010 Susceptible cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by stable transfection of sialoahesin and CD163 BMC Biotech., **10**:48.
18. **Diaz I., Darwich L., Pappaterra G., Pujols J., Mateu E.** 2005 Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. J. Gen. Vir. **86**: 1943-1951
19. **Diaz I., Darwich L., Pappaterra G., Pujols J., Mateu E.** 2006 Different European-type vaccines Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus have different immunological properties and confer different protection to pigs Virol. **351**: 249-259
20. **Diaz I., Mateu E.** 2005 Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs Vet. Immun. Immunopath. **106**: 107-112
21. **Dokland T.** The structural biology of PRRSV Virus Res. 2010, doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.029.
22. **Fagarsan S., Honjo T.** 2000 T-independent immune response new aspects of B cell biology Science **209**: 89-92
23. **Forsberg R., Oleksiewicz M.B., Krabbe Peterson A.M., Hein J., Bøtner A., Storgaard T.** 2001 A molecular clock dates the common ancestor of European type Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus at more than 10 years before the emergence of disease Virol. **289**: 174-179

24. **Forsberg R.** 2005 "Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes", *Mol Biol Evol.* **22** (4):1024-31.
25. **Garlapati S., Facci M., Polewicz M., Strom S., Babiuk L.A., Mutwiri G., Hancock R.E.W., Elliott M.R., Gerdts V.** 2009 "Strategies to link innate and adaptive immunity when designing vaccine adjuvant", *Vet. Immunol. Immunopath.* **128**: 184-191
26. **Gaudreault N., Rowland R.R., Wyatt C.R.** 2009 "Factors affecting the permissiveness of porcine alveolar macrophages for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus", *Arch. Virol.* **154** (1): 133-6
27. **Genzow M., Schwartz K., Gonzalez G., Anderson G., Chittick W.** 2009 "The effect of vaccination against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) on the Porcine Circovirus 2 (PCV2) load in porcine Circovirus associated disease (PCVAD) affected pigs", *The Can. j. Vet. Res.* **73**: 87-90
28. **Hannant D.** 2002 "Mucosal immunology: overview and potential in the veterinary species", *Vet. Immun. Immunopath.* **87**: 265-267
29. **Horter D.C., Pogranichniy R.M., Chang C.C., Evans R.B., Yoon K.J., Zimmerman J.J.** 2002 "Characterization of the carrier state in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection", *Vet. Microb.* **86**: 213-228
30. **Hu J, Ni Y, Dryman BA, Meng XJ, Zhang C.** 2010 "Purification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from cell culture using ultrafiltration and heparin affinity chromatography", *J Chromatogr A.* **1217**(21):3489-93.
31. **Kimman T.G., Cornelissen L.A., Moormann R.J., Rebel J.M.J., Stockhofe-Zurwieden N.** 2009 "Challenges for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) vaccinology", *Vaccine* **27**: 3704-3718
32. **Kittawornart A., Prickett J., Chittick W., Wang C., Engle M., Johnson J.,**

- Patnayak D., Schwartz T., Whitney D., Olsen C., Schwartz K., Zimmerman J.** 2010, 'Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance?' *Virus Res.* doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.025.
- 33. Laguna J., Salguero F.J., Fernandez de Marco M., Pallarés F.J., Bernabé A., Carrasco L.** 2009 'Changes in lymphocyte subsets and cytokines during European Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome: increased expression of IL-12 and IL-10 and proliferation of CD4 CD8<sup>high</sup>' *Viral immun.* **22** (4): 261-271
- 34. Laguna J., Salguero F.J., Barranco I., Pallarés-Gomez I.M., Barnabé A., Carrasco L.** 2009 'Cytokine expression by macrophages in the lung of pigs infected with the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus' *J. Comp. Path.* Doi: 10.1016/j.jcpa. 2009.07.004
- 35. Larsen D.L., Karasin A., Zuckermann E., Olsen C.W.** 2000 'Systemic and mucosal immune response to H1N1 influenza infection in pigs' *Microbiol.* **74**: 117-131
- 36. Laval F., Paillot R., Bollard S., Fischer L., Audonnet J.C., Andreoni C., Luillard V.** 2002 'Quantitative analysis of the antigen-specific IFN- $\gamma$  T cell-mediated immune response in conventional outbred pigs: kinetics and duration of the DNA-induced IFN- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> T cell response' *Vet. Immun. Immunopath.* **90**: 191-201
- 37. Lopez O.J., Osorio F.A.** 2004 'Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity' *Vet. Immun., Immunopath.* **102**: 155-163
- 38. Lowe J.F., Human R., Firkins L.D., Zuckerman F.A., Goldberg T.L.** 2005 'Correlation of cell-mediated immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus with protection against reproductive failure in sows during outbreaks of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in commercial herds' *JAVMA* **226**:

1707-1711

39. **Lunney J.K., Fritz E.R., Reecy J.M., Kuhar D., Prucnal E., Molina R., Christopher-Hennings J., Zimmerman J., Rowland R.R.** 2010 "Interleukin-8, interleukin-1beta, and interferon-gamma levels are linked to PRRS virus clearance" *Viral Immunol.* **23**(2):127-34
40. **Lunney J.K., Chen H.** 2010, "Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection", *Virus Res.*, doi:10.1016/j.virusres.2010.08.004.
41. **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.
42. **Mateu E., Tello M., Coll A., Casal J., Martin M.** 2006 "Comparison of three ELISAs for diagnosis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome" *Vet. Rec.* **159** (21): 717-8
43. **Mateu E., Diaz I.** 2008 "The challenge of PRRS immunology" *Vet. J.* **177** (3):345-51
44. **Meier W.A., Galetton J., Osorio F.A., Human R.J., Schnitzel W.M., Zuckerman F.A.** 2003 "Gradual development of the interferon- $\gamma$  response of swine to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection or vaccination" *Vie.* **309**: 18-31
45. **Megens HJ, Crooijmans RP, San Cristobal M, Hui X, Li N, Groenen MA.** 2008 "Biodiversity of pig breeds from China and Europe estimated from pooled DNA samples: differences in microsatellite variation between two areas of domestication",

Genet Sel Evol. 2008 Jan-Feb; **40** (1):103-28.

46. **Mogensen T.H.** óPathogen recognition and inflammatory signalling in innate immune defensesô 2009 Clin. Microbiol. Rew. **22** (2): 240-273

47. **Molina R.M., Cha S.H., Chittick W., Lawson S., Murtaugh M.P., Nelson F.A., Christopher-Hennings J., Yoon K.J., Evans R., Rowland R.R., Zimmerman J.J.** 2008 óImmune response against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus during acute and chronic infectionô Vet. Immuno. Immunopathol. **126** (3-4):283-92.

48. **Molitor T.W., Bautista E.M., Choi C.S.** 1997 óImmunity to PRRSV: double-edged swordô Vet. Microbiol. **55**: 265-276

49. **Murtaugh M.P., Xiao Z., Zuckerman F.** 2002 óImmunological response of swine to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infectionô Viral Immun. **15**: 533-547

50. **Music N, Gagnon CA.** 2010 óThe role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesisô Anim Health Res Rev. **14**:1-29

51. **Navarro P., Christenson R.K., Elkhart g., Bosworth B., Lonny J.K., Rothschild M., Lemke J., Butler J.E.** 1999 óGenetic differences in the frequency of the hinge variants of porcine IgA is breed dependentô Vet. Imm. Immunopath. **73**: 287-295

52. **Nelsen C.J., Murtaugh M.P., Faberge K.S.** 1999 óPorcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus comparison: divergent evolution on two continentsó J. Virol. **73**: 270-279

53. **Nielsen J., Botner A.** 1997 óHematological and immunological parameters of 4 ½ month old pigs infected with PRRS virusô Vet. Micr. **55**:289-294

54. **Nielsen J., Botner A., Tingstedt J.E., Aasted B., Johnsen C.K., Riber U., Lind P.**

2003. *óIn utero infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus modulates leukocyte subpopulation in peripheral blood and bronchoalveolar fluid of surviving piglets* Vet. Imm. Immunopath. **93**: 135-151.
55. **Oppriessing T., Patterson A.R., Madson D.M., pal N., Halbur P.G.** 2009 *óComparison of efficacy of commercial one dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination* Vaccine **27**: 1002-1007.
56. **Ostrowski M., Galeota J.A., Jar A.M., Platt K.B., Osorio F.A., Lopez O.J.** 2002 *óIdentification of neutralizing and non-neutralizing epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Ectodomain* J. Virol. **76** (9): 4241-4250
57. **Poli G., Cocilovo A.** 1996 *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*. UTET
58. **Prickett J., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K.J., Evans R.B., Zimmermann J.J.** 2008 *óDetection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions* J. Vet. Diagn. Invest. **20** (2): 156-163
59. **Riber U., Nielsen J., Lind P.** 2004 *óIn utero infection with PRRS virus modulates cellular functions of blood monocytes and alveolar lung macrophages in piglets* Vet. Imm. Immunopath. **99**: 169-177
60. **Saalmüller A., Pauly T., Höhlich B-J., Pfaff E.** 1999 *óCharacterization of porcine T lymphocytes and their immune response against viral antigen* Biotec. **73**: 223-233
61. **Salmon H.** 1999 *óThe mammary gland and neonate mucosal immunity* Vet. Imm. Immunopath. **72**: 143-155.
62. **Sandbulte M.R., Roth J.A.** 2004 *óMethods for analysis of the cell-mediated*

immunity in domestic animal speciesô JAVMA 225: 522-530.

63. **Shen HG, Beach NM, Huang YW, Halbur PG, Meng XJ, Opriessnig T.** 2010  
ôComparison of commercial and experimental porcine circovirus type 2 (PCV2)  
vaccines using a triple challenge with PCV2, porcine reproductive and respiratory  
syndrome virus (PRRSV), and porcine parvovirus (PPV)ô, Vaccine 28(37):5960-6.
64. **Shibata I., Yazawa S., Ono M., Okuda Y.** 2003 ôExperimental dual infection of  
specific pathogen-free pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome and  
Pseudorabies Virusô J. Vet. Med. B 50: 14-19.
65. **Sinkora J., Rehakova Z., Sinkora M., Cukrowska B., Tlaskalova-Hogenova H.,**  
2002 ôEarly development of immune system in pigsô Vet. Imm. And Immunopath. 87:  
301-306.
66. **Sipos W., Duvigneau C., Pietschmann P., Höller K., Hartl R., Wahl K.,**  
**Steinborn R., Gemeiner M., Willheim M., Schmoll F.** 2003 ôParameters of humoral  
and cellular immunity following vaccination of pigs with a European modified-live  
strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)ô Viral  
Immun. 16:335-346.
67. **Stadejek T, Stankevicius A, Storgaard T, Oleksiewicz MB, Belák S, Drew TW,**  
**Pejsak Z.,** 2002 ôIdentification of radically different variants of porcine reproductive  
and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for  
European and American virusesô J Gen Virol. 83 (8):1861-73.
68. **Suradhat S., Thanawongnuwech R.** 2003 ôUpregulation of interleukin-10 gene  
expression in leukocytes of pigs infected with Porcine Reproductive and Respiratory  
Syndrome Virusô J. Gen.Vir. 84:2755-2760.
69. **Suradhat S., Thanawongnuwech R., Poovorawan Y.** 2003 ôUpregulation of IL-

- 10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virusô J. Gen. Vir. **84**: 453-459.
70. **Takamatsu H.H., Denyer M.S., Stirling C., Cox S., Aggarwal N., Dash P., Wileman T.E., Barnett P.V.** 2006 ôPorcine  $\gamma\delta$  T cell: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infectionô Vet. Imm. Immunopath. **112**:49-61
71. **Tyzard I.R.** Veterinary Immunology: an introduction. Seventh Edition 2006 Saunders
72. **Van Breedam W., Delputte P.L., Van Gorp H., Misinzo G., Vanderheijden N., Duan X., Nauwynck H.J.** 2010 ôPorcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophageô J Gen Virol. **91**(7):1659-67
73. **Vanhee M., Delputte P.L., Delure I., Geldhof M.F., Nauwynck H.J.** 2009 ôDevelopment of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus-neutralizing antibodiesô Vet. Res. **40** (63).
74. **Van der Linden I.F.A., Voermans J.J.M., Van der Linde-Bril E.M., Bianchi A.T.J., Steverink P.J.G.M.** 2003 ôVirological kinetics and immunological responses to a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection of pigs at different agesô Vaccine **21**: 1952-1957.
75. **Vincent A.L., Thacker B.J., Halbur P.G., Rothschild M.F., Thacker E.L.** 2006 ôAn investigation of susceptibility to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virusô J. Clin. Microbiol. **41**: 58-62.
76. **Xiao Z., Batista I., Dee S., Halbur P., Murtaugh m.P.** 2004 ôThe level of virus-specific T-cell and macrophages recruitment in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection in pigs is independent of the virus loadedô J. Virol. **78**: 5923-

5933.1

77. **Yoon I.J., Joo H.S., Goyal S.M., Molitor T.W.** 1994 A modified serum neutralization test for the detection of antibody to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol* **9**: 51-63
78. **Yoon K.J., Wu L.I., Zimmerman J.J., Hill H.T., Platt K.B.** 1996 Antibody dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol.* **9**:51-63
79. **Zimmermann F.A., Benfiels D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., torremorell M.** 2006 *Disease of Swine* 9<sup>th</sup> Edition, Blackwell Publishing **24**:387-417
80. **Zuckermann F.A., Garcia E.A., Luque I.D., Christopher-Hennings J., Doter A., Brito M., Osorio F.** 2007 Assessment of the efficacy of commercial Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serological response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters upon challenge. *Vet. Microbiol.* **123**: 69-85
81. **Welch S-K.W., Calvert J.G.** 2010 A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Res.* doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.018
82. **Wills R.W., Doster A.R., Galeota J.A., Sur J.H., Osorio F.A.** 2003 Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Clin. Microbial.* **41**:58-62

## **Allegato 1**

### **Purificazione PRRSV mediante gradienti di saccarosio**

1. Preparare una soluzione di saccarosio 15% e 45% in tampone TE
2. Lasciare una notte a 4°C
3. Chiarificare il virus in centrifuga a 5000 rpm per 15 minuti a 4°C
4. Recuperare il surnatante ed ultracentrifugare il medesimo ad una velocità di 40000 rpm a 4°C in rotore Tyne 50 Ti
5. Risospendere il pellet ottenuto in 1,1 ml di tampone TE e lasciare una notte a 4°C
6. Chiarificare nuovamente il virus a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C
7. Caricare 1 ml di virus sui due gradienti e centrifugare a 35000 rpm per un'ora a 4°C in un rotore SW-40
8. scansione dei gradienti a 254 nm e recupero delle frazioni

## **Allegato 2**

### **Analisi esguite sul plasma**

1. Il sangue contenuto nella provetta con litio-eparina deve essere mantenuto a temperatura ambiente per un massimo di 8 ore
2. In una piastra a 24 pozzetti distribuire 1ml/pz per quattro repliche dello stesso campione, a due dei quattro pozzetti aggiungere 0,1 ml di PRRSV (rispettivamente BS/114 e Lelystad) ad un titolo predeterminato di 700.000 TCID<sub>50</sub> di virus della PRRS in 0,1 ml e propagato su cellule MARC-145. Tale quantità corrisponde ad una molteplicità d'infezione (MOI) non superiore a 0,1 sulla base di una presenza minima di cellule mononucleate nel sangue suino pari a  $5 \times 10^6$  /ml. All'altro pozzetto aggiungere

0,1 ml di criolisato di cellule MARC-145 alla stessa numerosità necessaria a produrre il virus. Nel quarto pozzetto aggiungere solo 0,1 ml di PBS

3. La piastra viene messa in termostato a 37°C in presenza del 5% di CO<sub>2</sub> per una notte

4. Il giorno successivo, la piastra viene centrifugata a 2200 rpm per 10 minuti a 4°C, quindi si è provveduto a recuperare il plasma da ciascun pozzetto per le successive analisi

### **Metodica ELISA per Interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ).**

1. adsorbire una piastra Nunc maxi Sorp con Mab Capture P2F6 (a 4  $\mu$ g/ml) in tampone carbonato-bicarbonato 50  $\mu$ l/pz in tutti i pozzetti ed incubare per una notte a 5°C

2. Svuotare ed asciugare su carta assorbente

3. Aggiungere 200  $\mu$ l/pz di Assay Buffer e lasciare un'ora a temperatura ambiente (26°C)

4. Svuotare la piastra e lavare con wash buffer

5. Aggiungere tal quale lo standard di produzione interne (sovastante PBMC suini stimolati con PHA-P) 50  $\mu$ l/pz in almeno 4 pozzetti. I campioni di plasma stimolati con il PBS, con il virus PRRS e quelli stimolati con il criolisato di cellule MARC-145 vengono aggiunti in almeno 2 repliche da 50  $\mu$ l/pz per campione; solo Assay Buffer nei pozzetti (almeno 6) dedicati al controllo coniugato in altrettanti pozzetti dedicati al controllo substrato 50  $\mu$ l/pz

6. Incubare 1 ora a temperatura ambiente (26°C)

7. Senza svuotare, aggiungere 50  $\mu$ l/pz di Mab Biotina MP701B (2  $\mu$ g/pz) in Assay

Buffer in tutti i pozzetti

8. Incubare 1 ora a temperatura ambiente (26°C)
9. Lavare con wash buffer
10. Aggiungere 100 µl/pz di coniugato alla streptoavidina-HRP in assay buffer in tutti i pozzetti
11. Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (26°C)
12. Lavare con wash buffer
13. Aggiungere OPD 6ml + 4 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 vol) a 50 µl/pz
14. dopo 15 minuti bloccare con 50 µl/pz di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N
15. Leggere la piastra con lo spettrofotometro utilizzando per la lettura il filtro 492 nm

### **Metodica ELISA per Interleuchina 10 (IL-10)**

1. Ricostituire lo standard a 10000 pg/ml con il buffer di diluizione dello standard, lasciare per 10 minuti a temperatura ambiente prima di usarlo, utilizzare nell'arco di un'ora
2. Diluire lo standard in buffer designato per avere delle diluizioni seriali pari a: 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 0 pg/ml
3. Per ottenere la wash solution diluire 1 volume di soluzione in 24 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata, può essere conservata a 4°C per un max di 14 giorni
4. Per preparare la streptavidina-HRP, diluire 10 µl di streptavidina in 1 ml di diluente apposito per ogni 8 pozzetti utilizzati

### Esecuzione del test

1. Preparare 8 pozzetti, aggiungere 100 µl di standard diluente buffer ad ogni

pozzetto 0; i pozzetti riservati per il bianco vanno addizionati di 100 µl di buffer di diluizione

2. Aggiungere 100 µl degli standard ad ogni pozzetto dedicato
3. Aggiungere 50 µl di diluente standard buffer a ciascun pozzetto dei campioni e 50 µl di plasma da analizzare
4. Coprire la piastra e lasciare a temperatura ambiente per 1 ora
5. Eliminare il contenuto dai pozzetti e lavare per 4 volte
6. Aggiungere 100 µl di coniugato con il biotinilato tranne che nel pozzetto per il bianco
7. Coprire la piastra ed incubare a temperatura ambiente per un'ora
8. Eliminare il contenuto e lavare con wash buffer per 4 volte
9. Aggiungere 100 µl di coniugato con il biotinilato tranne che nel pozzetto per il bianco
10. Coprire la piastra ed incubare a temperatura ambiente per un'ora
11. Eliminare il contenuto e lavare con wash buffer per 4 volte
12. Aggiungere 100 µl di Streptavidina ricostituita a ciascun pozzetto, tranne che al bianco
13. Coprire la piastra e lasciare per 30 minuti a temperatura ambiente
14. Lavare per 4 volte la piastra
15. Aggiungere 100 µl di substrato cromogeno a ciascun pozzetto
16. lasciare a temperatura ambiente al buio per 30 minuti
17. Aggiungere stop solution 100 µl a ciascun pozzetto
18. Leggere a 450 nm con spettrofotometro entro 2 ore dall'aggiunta della stop solution

### **Metodica ELISA per Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$ )**

19. La titolazione del TNF- $\alpha$  viene eseguita mediante l'utilizzo di cellule di fibrosarcoma murino denominate WEHI-164
20. Queste cellule vanno preparate come una sospensione di 300000 cellule per ml in RPMI addizionato del 10% di siero fetale bovino e distribuite in una piastra per colture cellulari 96 pozzetti
21. Quindi si procede con la distribuzione del campione in doppio e diluiti 1:4 in RPMI +10% SFB, seguono 4 diluizioni seriali in log<sub>4</sub>
22. Lo standard suino viene diluito 1:20 in RPMI + 10% di SFB con diluizioni seriali in log<sub>4</sub>
23. Il volume finale di ciascun campione e reagente deve essere uguale a 50  $\mu$ l
24. Per il controllo cellule ed il bianco si distribuiscono rispettivamente 50  $\mu$ l/pz di RPMI + 10% di SFB per le prime e 100  $\mu$ l per le seconde
25. Quindi aggiungere alle cellule actinomicia D in ragione di 2  $\mu$ g/ml
26. Incubare 18 ore a 37°C in termostato al 5% di CO<sub>2</sub>
27. Aggiungere a tutti i pozzetti 20  $\mu$ l di MTT ed incubare 2 ore a 37°C in termostato al 5% di CO<sub>2</sub>
28. Aggiungere in tutti i pozzetti 100  $\mu$ l di soluzione di lisi MTT
29. Incubare 1,5-2 ore a 37°C in termostato al 5% di CO<sub>2</sub>
30. Leggere dopo 1,5 ore a 570 nm

### **Allegato 3**

#### **Analisi eseguite sulle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC)**

1. Il sangue rimanente nella provetta con litio-eparina, viene diluito (1:2) in PBS,

quindi stratificato su Histopaque 1.077

2. Si centrifuga a 800 g per 30 minuti a 18°C
3. Si recupera l'anello costituito dai mononucleati del sangue periferico (PBMC) che si forma tra l'Histopaque ed il plasma e lo si pone in terreno colturale (RPMI)
4. Si procede con una serie di lavaggi avendo cura di eliminare il surnatante e risospendere il pellet che si forma sempre in RPMI
5. Nel caso in cui vi siano globuli rossi insieme al pellet, si può utilizzare cloruro di ammonio per lisare gli stessi
6. Si procede con la conta dei PBMC mediante strumento conta cellule e si attuano le opportune diluizioni per aggiungere il numero ottimale di cellule da utilizzare nella prova ELISpot

### **Metodica ELISpot per valutazione cellule secernenti Interferone gamma**

Primo giorno

7. Sensibilizzare la piastra con anticorpo primario per il rilevamento dell'IFN- $\gamma$ , allestire 12 pozzetti per ciascun campione: 3 pz per stimolo antigenico, 3 pz per controllo positivo (Con-A), 3 pz per controllo cellule e 3 pz per controllo negativo (solo terreno)
8. Lasciare a 5°C per una notte

Secondo giorno

9. Lavare la piastra, due volte con PBS ed una volta con RPMI
10. Bloccare la reazione con terreno RPMI contenente il 10% di siero fetale bovino (100  $\mu$ l/pz)
11. Incubare a 37°C per 1 ora

12. Quindi aggiungere i rispettivi stimolanti (PRRSV e Con-A) e terreno, solo successivamente le cellule ( $5 \times 10^5$ /pz)

13. Quindi incubare a 37°C per una notte

Terzo giorno

14. Lavare la piastra con PBS+Tween20 almeno 3 volte

15. Aggiungere l'anticorpo biotinilato e lasciare per 1 ora a 37°C

16. Lavare di nuovo con PBS+Tween 20 ed aggiungere la streptavidina HRP ed incubare a 37°C per 1 ora

17. Lavare con PBS+Tween20 ed aggiungere il TMB, lasciare al buio per circa 20 minuti

18. Quando si legge la piastra, togliere il colorante

Come controllo negativo utilizzare le cellule MARC-145 (criolisato)

### **Metodica di proliferazione linfocitaria**

19. I PBMC ottenuti vanno risospesi in RPMI con il 10% di siero fetale bovino (SFB), lo 0,5% di antibiotico e 50  $\mu$ M di  $\beta$ -mercaptoetanololo

20. Distribuire 500.000 cellule/pz in una piastra a 96 pozzetti divisa in tre parti: una per le cellule stimulate con il virus, una con il mitogeno rappresentato dalla concanavalina A (ConA) ed una come controllo negativo

21. Aggiungere 100  $\mu$ l di virus della PRRS 107,24TCID<sub>50</sub>, 5  $\mu$ g/ml di Con A e come controllo si possono utilizzare delle cellule di suino non infettate

22. Incubare a 37°C per 4 giorni in 5% di CO<sub>2</sub>

23. Alla piastra vengono aggiunti 0,5  $\mu$ Curie di timidina triziata e si incuba per 16-20 ore a 37°C in termostato al 5% di CO<sub>2</sub>

24. Le cellule vengono poi raccolte su filtri di fibra di vetro mediante filtri Harvester Filtermate 196 e lavate con H<sub>2</sub>O distillata; i filtri sono essiccati a temperatura ambiente per una notte

25. la radioattività associata ai singoli pozzetti viene letta mediante apparecchio Matrix 9600 Direct Beta Counter. I risultati sono espressi come indice di stimolazione e si calcola come rapporto della media delle cellule per milione ( $\mu$  cpm) dei pozzetti stimolati con antigene e la media cpm dei pozzetti non stimolati.

#### **Allegato 4**

##### **Analisi eseguite sul siero**

1. Il sangue contenuto nelle provette senza anticoagulante devono essere conservate ad una temperatura di 4°C per un massimo di 18-20 ore
2. I campioni devono arrivare in laboratorio refrigerati al fine di mantenere inalterata la vitalità dell'eventuale materiale virale presente nei campioni prelevati
3. In laboratorio le provette vengono centrifugate a 2000 rpm per 10 minuti a 4°C e si recupera il siero che può essere utilizzato immediatamente oppure conservato a -20°C per le successive analisi

##### **Metodica di sieronutralizzazione**

4. I sieri vanno posti in bagnomaria per 30 minuti a 56°C. In una piastra per micrometodo a 96 pozzetti a fondo piatto, individuare, come da schema sottostante, una colonna adibita a controllo cellule (colonna 12) ed una a controllo virus (colonna 11)
5. Una volta che i sieri sono stati sottoposti a trattamento termico, metterli a 4°C per raffreddarli

6. Intanto preparare una piastra a 96 pozzetti fondo ad U in cui mettere una quantità di terreno costituito da MEM senza siero fetale bovino uguale a quella scelta per i sieri in esame (ad esempio 50  $\mu$ l e 50  $\mu$ l)
7. Quindi prendere i sieri e distribuirne 50  $\mu$ l nella prima fila, due repliche per ogni campione, e procedere con le diluizioni seriali fino all'ultima fila
8. Aggiungere una uguale quantità di terreno MEM addizionato con siero fetale bovino in tutti i pozzetti
9. Porre a 4°C per una notte

## SECONDO GIORNO

1. Controllare lo stato di confluenza delle cellule MARC-145 e verificare che il monostrato cellulare sia al 80%-90%
2. Distribuire 50  $\mu$ l di terreno MEM senza siero fetale bovino nelle colonne da 1 a 11, righe da A a H, 50  $\mu$ l nella colonna 12 A-H. Inoculare 50  $\mu$ l di ciascun siero in esame inattivato nel primo pozzetto delle rispettive colonne (1-10)
3. Diluire serialmente i sieri in esame (A-H), aggiungere 100 DCP50 di virus della PRRS utilizzato per la prova e diluito in terreno MEM, tranne che nei pozzetti dedicati al controllo cellule (colonna 12, righe A-H)
4. Gli isolati di campo utilizzati per la prova saranno differenti fra di loro, infatti si provvederà ad individuare isolati con un grado di omologia variabile rispetto al ceppo di riferimento (Lelystad); tale grado di omologia comprenderà isolati vicini (fra il 90% ed il 100%) e lontani (80%-90%)
5. Nella colonna allestita per il controllo virus, procedere come segue:
  - preparare tre provette con 4,5 ml di terreno (MEM)
  - aggiungere alla prima provetta 0,5 ml del virus già diluito a 100 DCP50

- trasferire nella seconda provetta 0,5 ml della diluizione precedente e ripetere per la terza provetta
- aggiungere tali diluizioni ai pozzetti della colonna 11 del controllo virus, in doppio per ciascuna diluizione ( $50^{-1}$ /pz)

6. Agitare delicatamente la piastra ed incubare a 37°C per 1 ora e 30 minuti in termostato a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub>

7. Aggiungere 100 µl di terreno MEM addizionato con il 3 di siero fetale bovino e lasciare in termostato a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub>

8. Incubare a 37°C per 3 giorni ed eseguire la lettura mediante microscopio rovesciato

Il titolo anticorpale viene valutato come la più alta diluizione del siero in cui non si evidenzia effetto citopatico (ECP)

Dopo tre giorni di incubazione e valutazione dell'eventuale presenza dell'effetto citopatico, si può procedere con la metodica di immunoperossidasi per una lettura più corretta del risultato.

1. Eliminazione del campione dalla piastra, facendo attenzione a non toccare il fondo del pozzetto con il puntale per non danneggiare il tappeto cellulare

2. Lavare una volta tutti i pozzetti con etanolo tenuto a -20°C (100 µl)

3. Lasciare l'etanolo per 30 secondi e, quindi, eliminare sempre facendo attenzione a non toccare il pozzetto con il puntale

4. Aggiungere di nuovo etanolo (150 µl) e lasciare in congelatore a -20°C per almeno due ore, meglio procedere il giorno dopo con la metodica di immunoperossidasi

Il giorno successivo togliere la piastra dal congelatore e lasciare a temperatura ambiente per 5-10 minuti

1. Eliminare l'etanolo dalla piastra ed eseguire due lavaggi con PBS addizionato dello

0,05% di Tween20, il terzo lavaggio va effettuato con PBS e 0,05% di Tween 20 addizionato con BSA

2. Lasciare tale soluzione di lavaggio per 10 minuti
3. Eliminare il liquido dalla piastra ed aggiungere una soluzione costituita da PBS addizionato con lo 0,05% di Tween 20 e lo 0,3% di acqua ossigenata (50 µl/pozzetto) e lasciare a temperatura ambiente per 30 minuti
4. Lavare di nuovo per tre volte sempre con PBS e Tween 20
5. Intanto preparare l'anticorpo primario che va diluito sempre in PBS e Tween20 che messo in tutti i pozzetti (50 µl)
6. Lasciare incubare per 1 ora a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>
7. Lavare di nuovo per tre volte con PBS e Tween20
8. Aggiungere la biotina diluita 1:2000 sempre in PBS e Tween20 (50 µl/pozzetto)
9. Lasciare incubare per 1 ora a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>
10. Lavare per tre volte con PBS e Tween20 ed aggiungere la streptavidina sempre diluita 1:2000 in PBS e Tween20 (50 µl/pozzetto)
11. Incubare 30-45 minuti in termostato a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>
12. Lavare per tre volte con PBS e Tween20
13. Aggiungere il colorante TMB 50 µl/pozzetto e lasciare al buio per 10 minuti
14. Lavare con acqua deionizzata e lasciare per 10 minuti
15. Eliminare l'acqua ed aggiungere ad ogni pozzetto 50 µl di rosso neutro
16. Lasciare per 30 secondi e lavare molto bene, in modo da togliere tutto l'eccesso di rosso neutro

Leggere al microscopio; i pozzetti che presentano un tappeto cellulare integro e con un colore rosso, risultano negativi, mentre quelli che hanno un monostrato distrutto e con

dei punti viola di dimensioni variabili, sono quelli positivi. Attenzione perché anche il possibile inquinamento può presentare le medesime caratteristiche. Per cui è molto importante verificare le cellule prima di fissarle, perché in questo modo si capisce se c'è stato un inquinamento oppure no.

### **Metodica ELISA per valutazione immunità umorale**

1. Diluire i campioni in esame 1:40 utilizzando l'apposito buffer di diluizione
2. Distribuire  $100 \mu\text{l}$  di controllo negativo non diluito in doppio sia nella striscia in presenza di PRRSV sia in quella priva di PRRSV, la stessa cosa per il controllo positivo
3. Quindi distribuire  $100 \mu\text{l}$  di campione pre-diluito in doppio
4. Incubare 30 minuti a temperatura ambiente
5. Eliminare il liquido e lavare con apposito wash buffer per 3 volte
6. Aggiungere  $100 \mu\text{l}$  di anti-porcine HRPO coniugato in ciascun pozzetto
7. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente
8. Lavare nuovamente per tre volte
9. Aggiungere  $100 \mu\text{l}$  di colorante e lasciare al buio per 15 minuti
10. Aggiungere  $100 \mu\text{l}$  di stop solution a ciascun pozzetto
11. Leggere la piastra mediante spettrofotometro con filtro a 650 nm

Il risultato viene espresso in densità ottica (OD), la presenza o l'assenza di anticorpi nei confronti del virus della PRRS viene determinato calcolando il rapporto S/P e cioè il rapporto tra l'OD corretta del campione e l'OD media corretta del controllo positivo.

Quindi, se il rapporto OD è inferiore a 0,4, il campione viene considerato negativo, mentre se è superiore a 0,4, il campione sarà valutato come positivo.

## **Metodica di Retro-Transcrittasi di Reazione a Catena delle Polimerasi (RT-PCR)**

1. Aliquotare 200  $\mu$ l di siero in esame in Eppendorf da 2 ml e procedere con l'estrazione dell'RNA virale

l'estrazione può essere eseguita sia manualmente che meccanicamente, utilizzando il sistema automatizzato di estrazione Qiacube, tramite l'utilizzo di colonne di affinità (Spin Columns). La quantità di campione da utilizzare e le modalità di estrazione sono riportate nelle istruzioni del Kit Rneasy Mini.

Di seguito sono schematizzate le fasi di estrazione:

- Aggiungere 350  $\mu$ l di  $\beta$ RLT BUFFER e 3,5  $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanol nella micro-provetta da 1,5 ml dei campioni precedentemente preparati, mescolare con vortex
- Caricare ogni preparazione in una Spin Column e centrifugare per 15 secondi a 8000 g, eliminare l'eluato
- Aggiungere nella Spin Column 350  $\mu$ l di  $\beta$ RW1 BUFFER e centrifugare 15 secondi a 8000 g, eliminare l'eluato
- Preparare una mix contenente per ogni campione 10  $\mu$ l di Dnase Stock Solution e 70  $\mu$ l di  $\beta$ RDD BUFFER
- Aggiungere direttamente al centro della membrana della Spin Column la mix precedentemente preparata ed attendere 15 minuti
- Aggiungere nella Spin Column 350  $\mu$ l  $\beta$ RW1 BUFFER e centrifugare 15 secondi a 8000 , eliminare l'eluato
- Aggiungere nella Spin Column 500  $\mu$ l di  $\beta$ RPE BUFFER e centrifugare 15 secondi a 8000 g, eliminare l'eluato
- Aggiungere nella Spin Column 500  $\mu$ l di  $\beta$ RPE BUFFER e centrifugare per 2

minuti a 8000 g per asciugare completamente la membrana

- Al fine di eluire l'RNA purificato, mettere la colonna in una provetta contenente l'RNA a temperatura di -20°C fino alla preparazione della reazione di RT-Real- Time-PCR

Retro-trascrizione dell'RNA ed amplificazione del c-DNA tramite Real-Time PCR (RT-Real Time PCR):

- Distribuire la mastermix in ragione di 17 µl nelle microprovette da 0,2 ml precedentemente siglate con il numero dei campioni
- Aggiungere nella provetta utilizzata come controllo mastermix negativo: 3 µl di acqua bidistillata
- Aggiungere nella provetta utilizzata per la preparazione del controllo negativo. 3 µl di RNA totale del controllo negativo di estrazione
- Aggiungere nelle provette preparate in triplicato e siglate con il numero d'identificazione dei campioni: 3 µl di RNA totale del rispettivo campione
- Aggiungere nella provetta utilizzata come controllo positivo: 3 µl di RNA totale del controllo positivo PRSV
- Trasferire microprovette nello strumento Real-Time PCR programmato con i seguenti parametri di amplificazione ed impostato per la lettura della sonda TET

| Fase                                           | Temperatura | Tempo  | N° cicli |
|------------------------------------------------|-------------|--------|----------|
| Retrotrascrizione                              | 50°C        | 20 min | 1        |
| Denaturazione iniziale                         | 95°C        | 5 min  | 1        |
| Denaturazione                                  | 95°C        | 15 sec | 40       |
| Annealing/estensione<br>e<br>Lettura emissione | 60°C        | 45 sec |          |

### Primer per l'espressione genica delle citochine

I primers per la valutazione dell'espressione dei geni per IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ed IL-10 sono stati disegnati utilizzando il programma *Beacon Designer<sup>TM</sup>* (Premier Biosoft International) e la loro specificità è stata messa a punto utilizzando il software BLAST.

| PROTEINE                               | GENE | PRIMERS                                                                                                                | Product lenght | Gene Bank gi-number                              |
|----------------------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------|
| IFN- $\gamma$                          | IFNG | F: 5' GCTCTGGGAAACTGAATGACTTCG 3'<br>R: 5' TGACTTCTCTTCCGCTTTCTTAGG 3'                                                 | 144 bp         | NM_213948                                        |
| IL1- $\beta$                           | IL1B | F: 5' AATTCGAGTCTGCCCTGTACCC 3'<br>R: 5' TGGTGAAGTCGGTTATATCTTGGC 3'                                                   | 110 bp         | NM_001005149                                     |
| TNF- $\alpha$                          | TNF  | F: 5' TGCCTACTGCACTTCGAGGTTATC 3'<br>R: 5' GTGGGCGACGGGCTTATCTG 3'                                                     | 125 bp         | NM_214022                                        |
| <i>Sus scrofa</i> beta-2-microglobulin | B2M  | F: 5' CGCCCCAGATTGAAATTGATTTC 3'<br>R: 5' GCTATACTGATCCACAGCGTTAGG 3'                                                  | 139 bp         | NM_213978                                        |
| PRRSV                                  | ORF6 | F: 5' GTAGAAAGTGCTGCAGGTCTCCA 3'<br>R: 5' CACGAGGCTCCGAAGTCCT 3'<br>Probe:<br>FAM-5' CGCTGTGAGAAAGCCCGGACTAACA 3'-BHQ1 | 116 bp         | See: Revilla-Fernandez et al., 2005 (references) |

L'amplificazione del SYBR Green I Real Time PCR è stata attuata mediante CFX96<sup>TM</sup> Real Time System (Bio-Rad, Milano, Italia).

La PCR è stata effettuata dopo il passaggio della trascrittasi inversa.

1. 20  $\mu$ l di una mix PCR contenente una concentrazione finale di 1x *Q<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix* (Bio-Rad, Milano, Italia), 0,2  $\mu$ M di ciascuna combinazione di primer e 4  $\mu$ l di cDNA
2. Distribuire in piastra per PCR
3. Una mix senza cDNA è stata utilizzata come controllo negativo
4. Le reazioni sono state sottoposte a differenti cicli: 95°C per 3 min, 40 cicli di denaturazione a 95°C per 5 s, annealing a 60°C per 20 s
5. Lettura della piastra automatica