

INDICE

INDICE.....	1
1. INTRODUZIONE	3
2. EZIOLOGIA.....	5
2.1 <i>Tassonomia e caratteristiche virali.....</i>	5
2.2 <i>Organizzazione genomica</i>	5
2.3 <i>Ciclo di replicazione</i>	8
3. EPIDEMIOLOGIA	11
3.1 <i>Distribuzione geografica.....</i>	12
3.2 <i>Vie di trasmissione diretta.....</i>	13
3.3 <i>Vie di trasmissione indiretta.....</i>	14
3.4 <i>Infezione persistente</i>	16
3.5 <i>Fattori di rischio</i>	17
4. PATOGENESI.....	19
4.1 <i>Stadio acuto dell'infezione</i>	19
4.2 <i>Stadio persistente dell'infezione.....</i>	22
4.3 <i>Meccanismi patogenetici.....</i>	22
4.4 <i>Risposta immunitaria</i>	23
4.5 <i>Infezioni associate.....</i>	27
5. SINTOMATOLOGIA	29
5.1 <i>Infezione epidemica.....</i>	29
5.2 <i>Infezione endemica.....</i>	30
5.3 <i>Fattori condizionanti la manifestazione clinica</i>	30
5.4 <i>Lesioni.....</i>	31
6. DIAGNOSI.....	33
6.1 <i>Diagnosi clinica ed anatomo-patologica.....</i>	33
6.2 <i>Diagnosi virologica.....</i>	33
6.3 <i>Diagnosi sierologica</i>	36
7. PREVENZIONE E CONTROLLO	39
7.1 <i>Prevenzione</i>	39
7.2 <i>Controllo</i>	40
7.3 <i>Eradicazione.....</i>	42
PARTE SPERIMENTALE.....	45
8. SCOPO DELLA TESI.....	47

9. MATERIALI E METODI	49
<i>9.1 Infezione sperimentale.....</i>	<i>49</i>
<i>9.2 Metodiche biomolecolari.....</i>	<i>51</i>
<i>9.3 Validazione.....</i>	<i>58</i>
10. RISULTATI	63
<i>10.1 Analisi dei risultati di validazione delle metodiche RealTime RT-PCR SybrGreen e RealTime RT-PCR con sonda (HighConfidence / HighSensitivity)</i>	<i>63</i>
<i>10.2 Risultati delle analisi sui campioni sperimentali.....</i>	<i>66</i>
<i>10.3 Comparazione tra i metodi diagnostici (RT-PCR classica e RealTime RT-PCR con sonda).....</i>	<i>73</i>
<i>10.4 Comparazione tra le matrici</i>	<i>77</i>
11. DISCUSSIONE DEI RISULTATI	83
<i>11.1 Risultati di validazione delle metodiche</i>	<i>83</i>
<i>11.2 Risultati delle analisi sui campioni sperimentali.....</i>	<i>83</i>
12. CONCLUSIONI.....	85
BIBLIOGRAFIA	87
APPENDIX 1	99
<i>RT-PCR Classica two steps.....</i>	<i>99</i>
APPENDIX 2	103
<i>RealTime RT-PCR Commerciale.....</i>	<i>103</i>
RINGRAZIAMENTI	105

1. INTRODUZIONE

I danni provocati dalla Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) rappresentano uno dei maggiori problemi sanitari e gestionali cui l'allevamento suinicolo da riproduzione deve oggi far fronte; dopo il suo avvento all'inizio degli anni '90, infatti, ha costretto allevatori e veterinari a mettere a punto diversi programmi di prevenzione e/o controllo tali da ridurre le perdite economiche che questa malattia causa con i suoi effetti deleteri sui parametri produttivi e riproduttivi. Il monitoraggio dei capi dei diversi reparti dell'allevamento si basa su analisi periodiche dello stato anticorpale e virologico.

Attraverso questo mio lavoro su campioni ottenuti da una infezione sperimentale con PRRSv in soggetti *naïve* per ottenere campioni biologici durante tutta la dinamica di infezione, è stata validata una metodica di diagnostica biomolecolare (quantitative RealTime RT-PCR), per poter dare una quantificazione ai risultati di positività a PRRSv ottenuti da campioni di siero e anche di matrici alternative come ad esempio il tampone salivare.

Nel complesso lo studio è stato sviluppato in quattro diverse fasi:

- 1. Preparazione del virus per l'inoculo**
- 2. Infezione**
- 3. Campionamento**
- 4. Analisi**

La quantificazione del titolo virale e la messa a punto di strumenti diagnostici validi anche su matrici alternative al siero, e quindi più pratiche nel campionamento, rappresentano le sfide contingenti per rendere il controllo di questa infezione più efficace ed efficiente anche in termini di tempi e costi.

Luca Panzavolta

Parole chiave: *PRRS, PRRSv, biomolecular diagnosis, quantitative RealTime RT-PCR validation.*

2. EZIOLOGIA

2.1 Tassonomia e caratteristiche virali

Il virus della PRRS (PRRSv) è un piccolo virus a RNA, di 50-65 nm di diametro, appartenente all'ordine *Nidovirales*, famiglia *Arteriviridae*; quest'ultima comprende anche il virus dell'arterite equina (EAV), il virus della febbre emorragica delle scimmie (SHFV) ed il virus della lattato-deidrogenasi (LDV) (Zimmerman et al., 2006; Balka et al., 2010). Caratteristica comune degli Arterivirus è la loro capacità di indurre una viremia prolungata e di causare infezioni persistenti, oltre al fatto di replicare nei macrofagi (Cho e Dee, 2006).

PRRSv presenta una superficie relativamente liscia ed è provvisto di *envelope*; questo racchiude il *nucleocapside* o *core* di forma cuboidale e diametro di 25-35 nm (Zimmerman et al., 2006). Il fatto che la particella virale sia circondata da un envelope ne condiziona la resistenza al di fuori dell'ospite e, secondo quanto riportato da Cho e Dee nel 2006, questa varia in base a:

- temperatura: PRRSv può sopravvivere per più di 4 mesi a temperature comprese fra -70 e -20°C, mentre la sua resistenza cala all'aumentare della temperatura stessa (fino a 6 giorni a 21°C, 24 ore a 37°C, 20 minuti a 56°C);
- pH: PRRSv rimane stabile ad un pH tra i 6,5 e i 7,5, mentre la sua infettività si riduce a valori di pH <6,0 o >7,65;
- esposizione a detergenti: sono efficaci nel ridurre l'infettività del virus. In particolar modo i solventi dei lipidi (ad esempio il cloroformio) sono in grado di degradare in maniera ottimale l'envelope del virus ed inibirne la replicazione.

2.2 Organizzazione genomica

Il genoma di PRRSv consiste di un singolo filamento di RNA a polarità positiva lungo 15,1 kb e contiene 9 segmenti di lettura (*open reading frames*, ORFs) (**Figura n. 1**) (Balka et al., 2010; Yu et al., 2010).

Gli ORFs 1a e 1b costituiscono più del 75% dell'intero genoma e codificano per la sintesi di enzimi responsabili della replicazione virale (RNA polimerasi RNA-dipendente detto anche RNA replicasi) (Balka et al., 2010); essi funzionano come una singola poliproteina che

viene processata in 12 proteine più piccole, denominate proteine non strutturali (NSP) (Meulenberg, 2000). Queste, oltre alla loro funzione nella replicazione virale, ricoprono anche un ruolo potenziale nelle metodiche diagnostiche e nell'efficienza della risposta immunitaria dell'ospite (Zimmerman et al., 2006).

I 7 ORFs più piccoli, da 2 a 7, codificano invece per le proteine strutturali: le proteine GP₂, GP₃, GP₄ e GP₅, codificate dai rispettivi ORFs, sono N-glicosilate, mentre non lo sono quelle del nucleocapside N (codificata da ORF7) e di membrana M (codificata da ORF6) (Meulenberg, 2000; Balka et al., 2010).

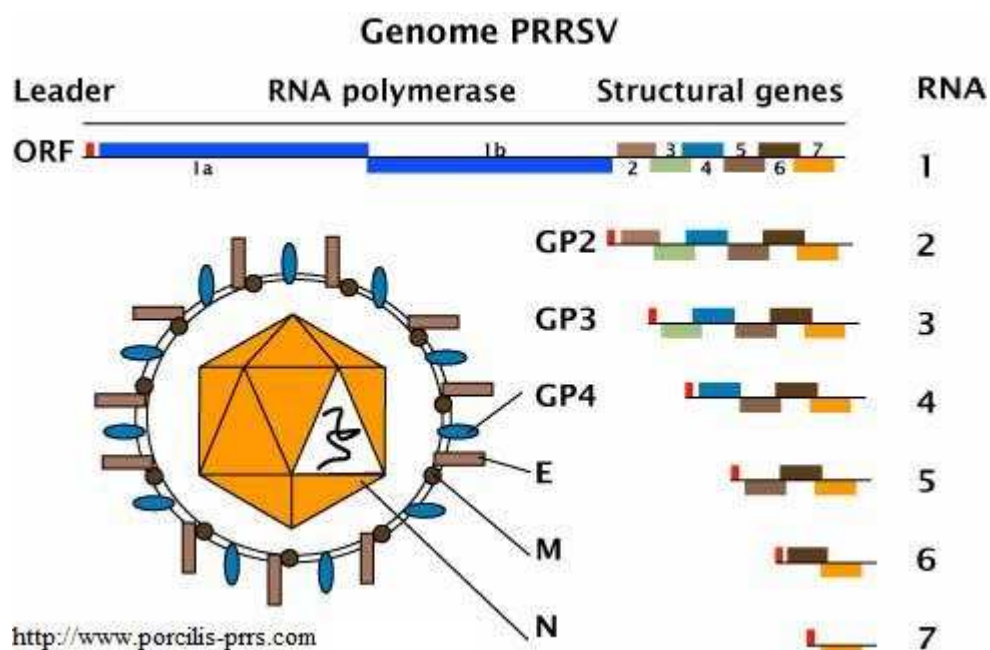


Figura n. 1 - Organizzazione genomica di PRRSV.

Le 3 maggiori proteine strutturali sono (Therrien et al., 2000; Zimmerman et al., 2006) (**Figura n. 2**):

- proteina N: è una proteina di piccole dimensioni (15 kDa) e fortemente basica, che interagisce con l'RNA virale nell'assemblaggio del nucleocapside; è la proteina più immunogena (fa liberare il maggior numero di anticorpi) e per questo viene utilizzata nei test diagnostici (Zimmerman et al., 2006);
- proteina M: proteina di matrice di 18 kDa, è importante per l'assemblaggio e la gemmazione del virus; inoltre la formazione di anticorpi neutralizzanti (protettivi) contro di essa dimostra come questa proteina espliciti un ruolo fondamentale sia

nell'interazione con i recettori cellulari che nell'infettività virale (Zimmerman et al., 2006);

- GP₅ o proteina E: è la proteina primaria dell'envelope (codificata da ORF5 e ORF2b) (Therrien et al., 2000) e come tale è coinvolta nel riconoscimento del recettore cellulare e nell'induzione dell'apoptosi nei macrofagi e nelle cellule germinali; anticorpi monoclonali (MAbs) diretti contro questa glicoproteina sono efficaci nella neutralizzazione del virus (Zimmerman et al., 2006).

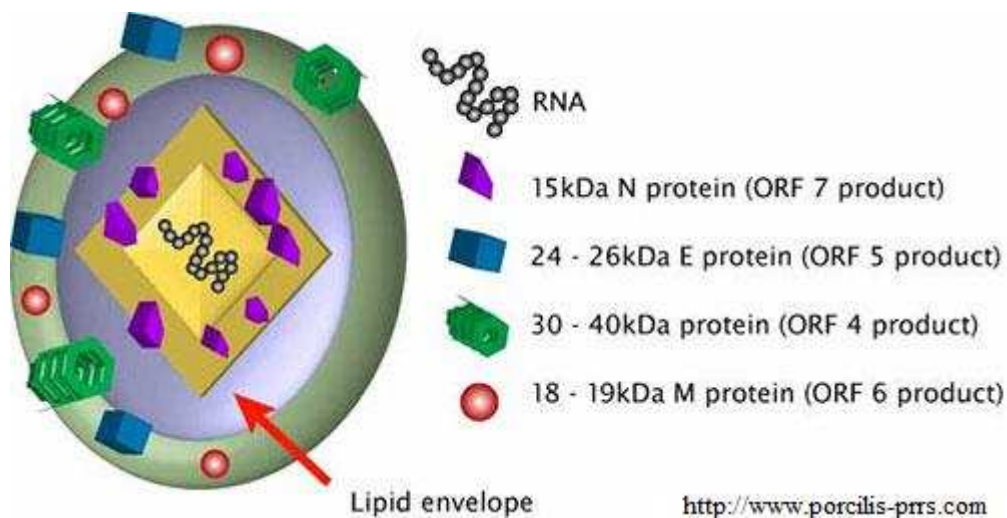


Figura n. 2 - Proteine strutturali di PRRSv.

PRRSv conta numerosi stipiti virali che differiscono tra loro per (Zimmerman et al., 2006):

- segni clinici della malattia;
- patogenesi a livello di apparato respiratorio e riproduttore;
- caratteristiche antigeniche;
- sequenze di RNA.

In particolare, il confronto del genoma dei due capostipiti virali, quello americano (VR-2332) e quello europeo (LV), ha rivelato una profonda differenza sia nella lunghezza che nella sequenza aminoacidica dei diversi tratti genomici: una grande diversità è stata dimostrata soprattutto a livello di ORF1a e 1b (Nelsen et al., 1999) e nella sequenza di aminoacidi (aa) delle proteine GP₅ e NSP2 (con una percentuale di aa omologhi del 55% e del 32%, rispettivamente) (Meulenbergh, 2000). Tali differenze assumono una rilevanza maggiore se si considera il fatto che due o più ceppi virali possono coesistere all'interno

dello stesso allevamento e ricombinarsi tra loro. È stato dimostrato in vitro che la ricombinazione è più facile che avvenga tra due ceppi dello stesso sottotipo (americano con americano e europeo con un altro europeo). Di questo si deve tener conto quando si opera sia sulla selezione di un efficiente ceppo vaccinale sia sulle performance delle metodiche diagnostiche (Zimmerman et al., 2006).

2.3 Ciclo di replicazione

PRRSv ha un tropismo cellulare ristretto all'interno del suo ospite (Therrien et al., 2000): non replica nelle cellule sanguigne e la viremia è data dall'intensità di replicazione nei tessuti (Diaz et al., 2005). I più sensibili all'infezione sono i macrofagi alveolari (PAMs) (Meulenberg, 2000), seguono macrofagi di tonsille, linfonodi, milza, fegato, timo, placche del Peyer, microglia (Allende et al., 2000; Therrien et al., 2000; Cano et al., 2009), ma è stata dimostrata la replicazione virale anche nelle cellule germinali dei testicoli di verri infetti (Sur et al., 1997; Therrien et al., 2000).

Trasferimenti sperimentali di RNA genomico hanno rivelato inoltre che PRRSv è comunque in grado di replicare in diverse linee cellulari che invece non possono essere infettate dal virus in natura (Meulenberg et al., 1998) e questo indicherebbe che il tropismo cellulare è determinato principalmente dalla presenza o meno di particolari recettori sulla superficie della cellula ospite (Meulenberg, 2000).

L'infezione della cellula ospite da parte di un virus inizia con il processo di adsorbimento, ovvero l'interazione tra strutture superficiali del virione (siti di adsorbimento) ed i recettori cellulari (Poli et al., 1998). Nel caso di PRRSv si ha un unico recettore, costituito da una glicoproteina del peso di 210 kDa presente solo sulla membrana cellulare dei PAMs sensibili all'infezione (Duan et al., 1998; Nauwynck et al., 1999).

Il legame di PRRSv ai macrofagi alveolari avviene secondo un meccanismo dose-dipendente e si completa entro un'ora ad una temperatura di 4°C. Il numero di recettori presenti sulla superficie di un singolo macrofago è piuttosto variabile, ma in genere supera i 10⁴ recettori/cell (Nauwynck et al., 2000).

L'entrata del virus nella cellula avviene per endocitosi: l'uso del microscopio elettronico ha rivelato la presenza di PRRSv all'interno di piccole vescicole ricoperte di clatrina. A 3-6 ore

dall'infezione si formano delle vescicole derivanti dal reticolo endoplasmatico, dotate di doppia membrana e che veicolano l'intero complesso replicativo (Meulenberg, 2000).

Non è ancora chiaro come il genoma virale si liberi dell'envelope e arrivi al citoplasma per la trascrizione e la traduzione, ma è stato dimostrato che la prima fase replicativa necessita di bassi valori di pH: l'acidificazione all'interno della vescicola comporta alterazioni di conformazione delle glicoproteine dell'envelope e/o di strutture del capsido e dà così avvio alla fusione di membrana (Nauwynck et al., 2000).

L'assemblaggio di PRRSv inizia con un processo di gemmazione (*budding*) del nucleocapside all'interno del lume del reticolo endoplasmatico liscio e/o delle membrane del Golgi; dopo questa gemmazione i virioni si accumulano in vescicole che vengono trasportate verso la membrana citoplasmatica, a livello della quale si fondono per liberare il virus. Prove sperimentali di crescita "one step" indicano che il rilascio massimo di PRRSv avviene 10-20 ore post-infezione (p.i.), con titoli che raggiungono i $10^{6.5}$ - $10^{7.5}$ Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID₅₀) per ml (Meulenberg, 2000).

3. EPIDEMIOLOGIA

La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) è una infezione relativamente “giovane”, capace in pochi anni di diffondersi a dismisura e causare ingenti danni economici al comparto suinicolo mondiale.

Nel 1987 si ha il primo caso negli U.S.A. La sindrome con eziologia sconosciuta viene chiamata Mystery Swine Disease (MSD) ed è caratterizzata principalmente da infertilità nelle scrofe e problemi respiratori nei suinetti (Nelsen et al., 1999; Balka et al., 2010). Nel 1988 arriva in Asia (Giappone 1988, Taiwan 1991) (Hirose et al. 1995). Nel 1990 sbarca in Europa, precisamente in Germania (Baron et al., 1992) primariamente e poi nel giro di pochi mesi in Belgio e Olanda (Wensvoort et al., 1991), nel marzo del 1991 in Spagna (Plana-Duran et al., 1992), nel novembre del 1991 in Francia (Baron et al., 1992) allargandosi a macchia d’olio in tutta l’area mediterranea ed oltre. La sua rapida diffusione e la novità del virus, fanno sì che le vengano attribuiti diversi nomi, tra cui “Lelystad virus” e “Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome PEARS” (Olanda), “Swine Infertility and Respiratory Syndrome virus BIAH-001” (U.S.A.), “Swine Arterivirus”, “Abortus blauw” e “Blue ear disease” (per il colore cianotico che assumono le orecchie degli animali colpiti) (Terpstra et al., 1991).

Nel luglio del 1991, Wensvoort e Terpstra insieme ai loro collaboratori isolano ed identificano presso i laboratori di Lelystad, in Olanda, l’agente eziologico della MSD (Nelson et al., 1993; Balka et al., 2010). In America invece tali studi eziologici richiedono più tempo ed il virus della “Swine Infertility and Respiratory Syndrome” (SIRS) (come li viene chiamata la malattia) viene isolato (Collins et al., 1992) e tipizzato (Benfield et al., 1992) solo nell’aprile del 1992. È evidente così che il ceppo europeo e quello americano del virus sono differenti, per cui quest’ultimo viene denominato “American Type Culture Collection (ATCC) VR-2332” (Collins et al., 1992; Snidjer et al., 2004). Il sequenziamento dell’intero genoma del virus della PRRS (PRRSv) avviene nel 1997 per il LV (Meulenberg et al., 1997) e nel 1999 per l’ATCC VR-2332 (Allende et al., 1999).

Diversi ricercatori si sono riproposti di studiare la filogenesi dei due diversi ceppi, per andare a ritrovare quello che sarebbe stato l’antenato comune. Al giorno d’oggi si discute su due differenti teorie: Forsberg (2005) ipotizza che nel 1880 ci fosse un antenato comune per

i ceppi europei e americani e che in seguito si sia evoluto di forma parallela nei due continenti, manifestandosi contemporaneamente nelle sue due forme cliniche alla fine degli anni ottanta; Stajeck et al. (2007) considerano la possibilità dell'emergenza di un nuovo virus o della diffusione di un ceppo già presente in Europa dell'Est, grazie a diversi fattori come il commercio, le nuove frontiere e la comparsa di linee genetiche migliorate dopo la II Guerra Mondiale.

Nel 2000 Blaha definisce quella della PRRS un'epidemiologia "pittoresca": l'infezione da PRRSv, infatti, non si comporta secondo i comuni pattern epidemiologici delle malattie trasmissibili, poiché presenta alcune caratteristiche chiaramente epidemiche, altre decisamente endemiche e molte altre che si collocano invece in un punto indefinito tra questi due estremi. Più precisamente la sindrome riproduttiva mostra caratteristiche tipiche di un'infezione epidemica, con lo sviluppo di un'efficace immunità protettiva capace di far tornare le performance di allevamento alla normalità in pochi mesi; la sindrome respiratoria invece mostra caratteristiche proprie di un'infezione endemica, con una risposta immunitaria debole e segni clinici di gravità fortemente variabile.

3.1 Distribuzione geografica

Attualmente la PRRS è endemica ed ubiquitaria pressoché in tutta la popolazione suina. Studi sierologici retrospettivi hanno dimostrato che PRRSv era presente all'interno della popolazione suina molto tempo prima della comparsa della malattia: nel 1979 in Canada, nel 1985 negli Stati Uniti ed in Corea del Sud, nel 1987 in Germania ed in Taiwan. Ad ogni modo, negli anni '90 l'infezione si è diffusa in tutto il mondo, raggiungendo una prevalenza del 60-80% di allevamenti infetti. Solo alcuni paesi sono ormai tuttora indenni da PRRSv: in Europa solo la Svizzera; in Oceania Nuova Zelanda ed Australia. Altri paesi (Bolivia, Cile, Repubblica Dominicana e Romania) dichiarano di tenerla confinata regionalmente (Beltran-Alcrudo, 2007).

In Italia oggi la situazione epidemiologica della PRRS è caratterizzata da una parte da un'elevata diffusione del virus in quasi tutti gli allevamenti (secondo lo studio di Candotti et al. nel 2006 è stimata al 90% delle aziende), anche se a volte senza una sintomatologia rilevabile, e dall'altra dalla circolazione di entrambi gli stipiti virali, seppure con una netta prevalenza di sierotipi europei (oltre il 90% degli isolati) (Cordioli, 2003).

3.2 Vie di trasmissione diretta

La trasmissione di PRRSv avviene principalmente attraverso il contatto diretto tra animali suscettibili e soggetti infetti ed eliminatori del virus (Albina, 1997). Questi, infatti, possono eliminare PRRSv attraverso molte secrezioni ed escrezioni per periodi variabili di tempo: nella saliva fino a 42 giorni p.i., nelle secrezioni nasali fino a 38 giorni p.i., nell'urina fino a 28 giorni p.i., nelle feci (e quindi nel liquame) fino a 35 giorni p.i. (dato molto dibattuto) (Prieto e Castro, 2005), nelle secrezioni mammarie di scrofe sensibili che contraggono l'infezione in gestazione avanzata (Zimmerman et al., 2006; Kang et al., 2009). Particolare attenzione merita la diffusione del virus attraverso il seme, dato il largo uso che oggi si fa della fecondazione artificiale nelle aziende. PRRSv è stato ritrovato nello sperma e nelle ghiandole bulbouretrali di verri infetti fino a 43 e 101 giorni p.i., rispettivamente; l'RNA virale invece è rinvenibile nell'eiaculato tramite PCR in forma intermittente (Christopher-Hennings et al., 2001) fino a 92 giorni p.i. (Christopher-Hennings et al., 1995; Zimmerman et al., 2006). La durata dell'eliminazione del virus con il seme è comunque variabile, in funzione di: (a) fattori individuali, (b) stipte virale e (c) tecnica diagnostica utilizzata (Prieto e Castro, 2005). In alcuni casi è stata descritta la presenza di animali portatori in allevamento, che incapaci di eliminare l'infezione da certi tessuti linfoidi, possono essere fonte d'infezione per periodi prolungati.

Il suino è recettivo all'infezione da PRRSv attraverso molteplici vie di infezione: intranasale, intramuscolare, orale, intrauterina e vaginale. Al mutare della via d'entrata e dell'età cambia anche la dose virale necessaria a realizzare l'infezione (Hermann et al., 2005): l'Infectious Dose 50 (ID50) per la via orale e quella intranasale è rispettivamente di $10^{5,3}$ e $10^{4,0}$ TCID₅₀, mentre l'inseminazione artificiale necessita di circa $10^{4,5}$ TCID₅₀ per essere infettante.

In genere i soggetti sono molto più sensibili all'infezione per via parenterale, ovvero attraverso soluzioni di continuo della cute, piuttosto che per via orale. Vie parenterali possono essere rappresentate in campo dalle consuete pratiche manageriali, come il taglio della coda, la limatura dei denti, le iniezioni (Pitkin et al., 2009); inoltre anche le frequenti lotte tra gli animali sono causa di possibili vie di trasmissione del virus, attraverso

morsicature con saliva infetta alla coda e alle orecchie, spellature ed abrasioni (Zimmerman et al., 2006).

PRRSv è trasmissibile anche per via verticale da scrofe viremiche ai feti attraverso un'infezione trans-placentare, che provoca la morte fetale o la nascita di suinetti infetti. Il virus può replicare nei feti a partire da 14 giorni di gestazione, ma l'infezione intrauterina nei primi due terzi di gravidanza è raramente segnalata, poiché PRRSv riesce ad attraversare efficientemente la placenta solo nella fase avanzata della gravidanza (Zimmerman et al., 2006).

3.3 Vie di trasmissione indiretta

La trasmissione dell'infezione può avvenire anche attraverso oggetti (attrezzatura, strumenti, indumenti), sostanze (acqua, cibo), vettori, aerosol (Zimmerman et al., 2006).

Attrezzature

Studi recenti hanno provato che PRRSv può essere diffuso tramite gli indumenti e in particolare stivali e tute si sono dimostrati potenziali fonti virali per gli animali sensibili.

Comunemente a quanto accade per altre infezioni, anche per la PRRS l'uso inappropriato di aghi rappresenta un possibile veicolo per la trasmissione virale tra gli animali.

È stato comunque dimostrato che l'attuazione di semplici misure di biosicurezza permette di limitare od impedire la trasmissione del virus: cambiarsi la tuta e gli stivali, lavarsi le mani, farsi la doccia prima e dopo essere venuti a contatto con gli animali, utilizzare calzature monouso e indossare guanti e vestiti puliti prima di entrare in azienda rappresentano i principali accorgimenti adottabili (Cho e Dee, 2006; Pitkin et al., 2009).

Veicoli di trasporto

I veicoli di trasporto rappresentano una possibile via di trasmissione per PRRSv, anche se il virus risulta particolarmente sensibile all'applicazione di disinfettanti e all'asciugatura dei mezzi di trasporto tramite aria compressa ad alte temperature (Cho e Dee, 2006).

La disinfezione richiede la rimozione di ogni traccia di materiale organico, dopodiché l'inattivazione del virus varia in funzione del tipo di disinfettante, del tempo di contatto con esso e della temperatura: a temperatura ambiente, per esempio, PRRSv è inattivato dai

prodotti a base di cloro in 10 minuti e dai composti iodici o dell'ammonio quaternario in 1 minuto (Zimmerman et al., 2006).

Insetti

Mosche e zanzare sono presenti comunemente negli allevamenti suini, soprattutto nei mesi estivi; in condizioni sperimentali esse si sono rivelate in grado di trasmettere meccanicamente PRRSv da soggetti infetti ad animali sensibili, anche in un raggio di 2,4 km. Gli artropodi albergano il virus nel tratto intestinale, ma non costituiscono dei vettori biologici per l'infezione; di conseguenza, la loro capacità di mantenere PRRSv nell'intestino dipende dalla carica virale post-ingestione e dalla temperatura ambientale.

Il controllo delle popolazioni di insetti all'interno dell'allevamento può essere condotto tramite il monitoraggio periodico delle prese d'aria, l'uso di comuni insetticidi ed una corretta gestione ambientale (Cho e Dee, 2006, Pitkin et al., 2009).

Mammiferi ed uccelli

PRRSv, prima di trasferirsi al suino domestico, probabilmente aveva come serbatoio una specie selvatica non ancora identificata. Studi sperimentali hanno però rivelato che un gran numero di specie, comprese topo, ratto, cane, gatto, opossum, procione, moffetta, passero comune e storno, non sono recettive al virus (Zimmerman e al., 2006) e non sono nemmeno in grado di agire da vettori meccanici o biologici dell'infezione (Cho e Dee, 2006).

Alcuni autori hanno proposto come potenziali vettori del virus gli uccelli acquatici, a causa della loro natura migratoria e della loro tendenza a nidificare in prossimità degli allevamenti. Poiché PRRSv può resistere in acqua fino ad 11 giorni, tale ipotesi in principio è stata considerata plausibile; tuttavia, studi successivi hanno dimostrato che soltanto il germano reale risulta sensibile all'infezione da PRRSv (Cho e Dee, 2006). Da un esperimento condotto da Zimmerman et. al. nel 1997 si è potuto infatti provare che suini esposti per via intranasale al virus isolato dalle feci di germano diventano viremici, sieroconvertono e trasmettono l'infezione ad animali sentinella. Questo dato è stato poi smentito da Trincado et al. nel 2004 e riconfermato da Cho e Dee nel 2006.

Anche il cinghiale è recettivo a PRRSv, sebbene indagini sierologiche indichino che l'infezione di cinghiali allo stato brado è relativamente rara; tuttavia, nelle aree in cui le

popolazioni selvatiche vivono in stretto contatto con quelle domestiche, è pensabile che le prime rappresentino una fonte di virus (Zimmerman et al., 2006).

Aerosol

La trasmissione aerea del virus era un tempo considerata la principale via d'infezione di PRRSv. Anche i dati raccolti durante i primi focolai registrati in Inghilterra indicavano infatti che il virus poteva diffondere tramite l'aria per 3 km di distanza (Edwards et al., 1992). In effetti la trasmissione aerea, insieme a quella legata agli insetti, potrebbe spiegare la capacità dell'infezione di diffondere in vaste aree in assenza di altre fonti di virus (maiali, oggetti, persone) (Zimmerman et al., 2006).

È difficile però documentare questo tipo di trasmissione e i risultati ottenuti da prove sperimentali in questo senso sono controversi. Studi condotti in laboratorio hanno dimostrato che la trasmissione aerea può avvenire solo entro piccole distanze: in una prova gli animali infetti hanno trasmesso il virus a soggetti sensibili separati da una distanza di 102 cm (Kristensen et al., 2004), in un'altra il passaggio dell'infezione tra animali disposti a 1,0-2,5 metri l'uno dall'altro è avvenuta nel 50% dei casi (Otake et al., 2002), in un'altra ancora Dee (2007) ha dimostrato la trasmissione tra due strutture lontane 120 metri. In generale, comunque, la trasmissione aerea è facilitata durante la stagione invernale, in condizioni di elevata umidità e di bassi valori di temperatura, velocità del vento, esposizione ai raggi ultravioletti (Albina, 1997) ed elevata densità suinicola (Dee, 2007).

3.4 Infezione persistente

La capacità di provocare infezioni croniche o persistenti nei suini è la caratteristica epidemiologica più rilevante di PRRSv. L'incidenza di infezioni persistenti non dipende dall'età degli animali al momento dell'infezione, la persistenza si può realizzare in ugual modo in soggetti giovani, adulti o che contraggono l'infezione in utero.

La presenza di soggetti persistentemente infetti e la continua disponibilità di animali sensibili al virus sono alla base della comparsa dell'infezione endemica in un allevamento. Il ricircolo virale è mantenuto grazie alla trasmissione dell'infezione dalla madre ai figli in utero o in allattamento e mediante il contatto di soggetti recettivi con altri infetti nelle diverse fasi di produzione. Dove animali sensibili ed infetti vivono in notevole promiscuità

tra loro, come nel reparto svezzamento, una gran parte della popolazione può infettarsi in poco tempo; tuttavia nelle aziende endemiche per PRRS si registrano marcate differenze nell'incidenza dell'infezione tra gruppi, box o stanze di animali (Zimmerman et al., 2006).

3.5 Fattori di rischio

Valutando il programma di controllo della PRRS attuato da una regione francese nel 1997, Le Potier et al. stabilirono che il 56% degli allevamenti esaminati aveva contratto l'infezione attraverso l'introduzione di animali infetti, il 21% tramite l'attrezzatura e/o il liquame, il 20% con l'acquisto di seme infetto ed il restante 3% da altre fonti.

In generale, il rischio di contrarre l'infezione da PRRSv per un allevamento suino è in funzione di:

1. vicinanza ad un allevamento infetto (meno di 500 metri, secondo Le Potier et al.);
2. l'introduzione della rimonta o di suini da ingrasso provenienti da un allevamento infetto (Mortensen et al., 2002);
3. numero di animali stabulati (Weigel, 2000);
4. entità della rimonta esterna (Albina, 1997);
5. acquisto di seme per le fecondazioni artificiali (Weigel, 2000; Mortensen et al., 2002);
6. mancanza di un periodo di quarantena per scrofette e verri da rimonta (Weigel, 2000).

Un nuovo campo d'interesse è lo studio della resistenza delle diverse razze suine all'infezione da PRRSv. Le razze Landrace, Large White e Yorkshire secondo Lewis et al. (2007) sarebbero più resistenti di Pietrain e Hampshire.

4. PATOGENESI

Sebbene la PRRS fosse stata inizialmente descritta come un'infezione acuta, causa di problemi respiratori nei giovani animali e di aborti tardivi nelle scrofe, è stato dimostrato che PRRSv è anche in grado di provocare infezioni persistenti (Suarez, 2000).

Oggi si possono così distinguere due stadi dell'infezione:

- uno *stadio acuto*, che comprende le prime 2 settimane d'infezione, durante il quale si rilevano i titoli virali più alti in tutti gli organi sensibili;
- uno *stadio persistente*, caratterizzato da bassi livelli di replicazione virale, ristretta solo ad alcuni organi.

4.1 *Stadio acuto dell'infezione*

L'infezione naturale da parte di PRRSv avviene principalmente attraverso: (i) l'ingresso del virus per via aerea, (ii) la sua replicazione nei macrofagi alveolari, (iii) la successiva viremia con disseminazione sistemica del virus (Van Reeth, 1997).

Dopo il suo ingresso, PRRSv replica inizialmente nei PAMs e si diffonde rapidamente agli organi linfoidi (tonsille, linfonodi, timo e milza), ai polmoni ed, in misura minore, ad altri tessuti, come cuore e cervello. Gli stipti più virulenti causano viremia già entro 12 ore dall'inoculazione del virus in alcuni soggetti e comunque entro 24 ore in tutti i suini. I titoli virali aumentano velocemente e raggiungono il loro picco nel siero, nei linfonodi e, soprattutto, nei polmoni 7-14 giorni p.i. con valori di 10^2 - 10^5 TICD₅₀ di virus per ml di siero o grammo di tessuto.

Le cellule che costituiscono il substrato primario per la replicazione virale sono i macrofagi alveolari (PAMs), quelli polmonari intravasali (PIMs) e quelli dei tessuti linfoidi. PRRSv può replicare anche nelle cellule della microglia, mentre non è in grado di moltiplicarsi in alcune cellule del sistema reticolo-endoteliale, come i monociti del circolo periferico, i macrofagi peritoneali e le cellule progenitrici del midollo osseo (Zimmerman et al., 2006).

È stato inoltre dimostrato che il virus ha una selettività spiccata per i PAMs dei soggetti d'età inferiore alle 6 settimane, per quelli ancora immaturi e per quelli appena attivati; il numero dei macrofagi sensibili all'infezione è infatti inversamente proporzionale all'età del suino infetto (Suarez, 2000).

In generale, durante la fase acuta dell'infezione si assiste alla manifestazione clinica della malattia ed alla comparsa delle lesioni macroscopiche a carico degli organi con i titoli virali più alti, ovvero polmoni e linfonodi.

Dopo il picco virale i titoli sierici del virus diminuiscono rapidamente: molti soggetti non mostrano più viremia già 28 giorni p.i., sebbene l'RNA virale sia stato rinvenuto nel siero a 251 giorni dall'infezione (Wills et al., 2003).

Infezione nella scrofa gravida

Scrofe e scrofette sono sensibili all'infezione di PRRSv sia per via aerea che venerea. Il periodo di incubazione è soggettivo, ma di solito i primi segni clinici si manifestano a partire da 2-7 giorni p.i.

Il virus, dopo una prima replicazione a livello alveolare, si diffonde a tutto l'organismo attraverso il circolo sanguigno, in forma libera od in associazione con monociti o leucociti; in questo modo può raggiungere anche l'apparato riproduttore, dando luogo allo sviluppo dei segni clinici associati alla riproduzione.

È tuttavia da sottolineare che l'infezione da PRRSv dalla fecondazione fino a metà della gestazione riveste un'importanza scarsa o addirittura nulla ai fini delle performance riproduttive. Il virus infatti non è isolabile negli embrioni quando l'infezione avviene prima dell'impianto di questi nell'endometrio (Prieto e Castro, 2000). La probabilità che l'infezione transplacentare avvenga (per opera del virus in forma libera oppure legato a cellule materne) e la gravità degli effetti che questa comporta aumentano al progredire della gravidanza. Infezioni nella fase avanzata della gestazione provocano infatti lesioni come distacchi multifocali della placenta ed arteriti necrotizzanti del cordone ombelicale, responsabili dell'alta incidenza di casi di aborto tardivo, parto precoce e morte fetale che si registrano durante i focolai della malattia.

Un altro effetto non trascurabile dell'infezione transplacentare tardiva è rappresentato dalla nascita di suinetti persistentemente infetti, che possono facilmente sviluppare una sintomatologia respiratoria o malattie secondarie (Prieto e Castro, 2000).

Infezione nel verro

La trasmissione venerea dell'infezione attraverso il seme di verri infetti è stata più volte dimostrata: la diffusione di PRRSv nel seme può avvenire in modo variabile fino a 92 giorni

dall'inoculazione di uno stipite selvatico del virus (Christopher-Hennings et al., 1995; Hennings, 2000).

L'infezione del testicolo da parte di PRRSv ha come target due tipi di cellule: le cellule germinali dell'epitelio dei tubuli seminiferi (soprattutto spermatidi e spermatociti) ed i macrofagi interstiziali del testicolo.

Il fatto che anche verri vasectomizzati possano trasmettere il virus con il seme (Hennings, 2000) e che la presenza di PRRSv nell'eiaculato termini al calare della viremia (Sur et al., 2000) dimostra che il virus proviene anche dal circolo sistemico e non esclusivamente dalla sua replicazione nel testicolo o nell'epididimo.

Conseguenze dell'infezione testicolare sono la formazione di cellule giganti multinucleate (MGCs) e la morte massiva per apoptosi delle cellule germinali; un aumento nello sperma del numero di spermatidi, spermatociti e MGCs che contengono PRRSv e che con ogni probabilità sono responsabili della trasmissione venerea del virus (Sur et al., 2000); un'alterazione qualitativa dello sperma dovuta a diminuzione della motilità spermatica, aumento delle anomalie morfologiche e delle gocce a livello citoplasmatico, diminuzione della percentuale di spermatozoi con l'acrosoma normale (Prieto e Castro, 2005).

Infezione nel lattonzolo

L'età dell'animale alla quale avviene l'infezione condiziona la manifestazione della sintomatologia (Rossow et al., 1994). I suinetti che nascono infetti possono presentare anoressia, dispnea, apatia, edema perioculare, congiuntivite, cianosi (Rossow et al., 1999). Negli animali di età più avanzata i sintomi si presentano più attenuati. La sintomatologia influisce sull'aumento della mortalità, sulla crescita degli animali, che rallenta risultando in un incremento del numero degli scarti, e sul tempo necessario per raggiungere il peso di vendita (Keffaber, 1989). Tanto la mortalità come la gravità dei sintomi sono legati alla presenza di altri patogeni che possono complicare ulteriormente il quadro clinico.

Infezione nel suino da ingrasso

I sintomi clinici sono dipendenti dall'età alla quale avviene l'infezione e dalla presenza di infezioni secondarie. Nell'ingrasso la sintomatologia respiratoria è più leggera e spesso prevalgono le forme subcliniche (Nodelijk, 2002).

4.2 Stadio persistente dell'infezione

PRRSv come già predetto, possiede proprietà comuni agli altri Arterivirus: la selettività per i macrofagi e la capacità di indurre infezioni persistenti.

Al termine della viremia, di diversa durata a seconda dell'età degli animali al momento dell'infezione e la dose infettante (Van Reeth, 1997), PRRSv continua a replicarsi a bassi livelli nei tessuti linfoidei (Zimmerman et al., 2006).

Si parla di infezione persistente quando la replicazione di PRRSv è ristretta ai tessuti linfoidei (tonsille, milza e linfonodi) o a sedi immuno-privilegiate come i testicoli, mentre risulta assente a livello polmonare e nei macrofagi alveolari (Benfield et al., 1998). Nello studio di Benfield il 100% dei suinetti nati vivi da scrofe infettate con PRRSv a 90 giorni di gravidanza manifesta un'infezione persistente e tende ad essere viremico fino a 11 settimane dopo la nascita. È ormai risaputo che sottopopolazioni di questi suinetti sono presenti in molti allevamenti che accusano problemi cronici riconducibili a PRRSv: soggetti persistentemente infetti funzionano da sorgente di virus per l'intera covata e per i suini sieronegativi del reparto svezzamento (Suarez, 2000). Dati sperimentali dimostrano che lo stress e l'immunodepressione possono causare una nuova escrezione del virus anche a più di 15 settimane dall'iniziale sieroconversione (Van Reeth, 1997).

4.3 Meccanismi patogenetici

PRRSv provoca la comparsa di lesioni e sintomatologia attraverso vari meccanismi:

1. apoptosi: è la causa maggiore di morte cellulare dovuta a PRRSv, sia delle cellule infette (apoptosi diretta) sia, soprattutto, di quelle non infette (apoptosi indiretta o "bystander"). Durante la fase acuta della malattia le cellule che vanno incontro ad apoptosi sono in numero maggiore di quelle infette e raramente contengono il virus: questo dimostra l'esistenza di un meccanismo indiretto di induzione all'apoptosi (Suarez, 2000). La causa dell'apoptosi diretta è quasi sicuramente riconducibile alla presenza sull'envelope virale di GP₅, proteina che nelle cellule di scimmia è in grado di dare da sola una intensa e rapida citotossicità (Suarez et al., 1996); il meccanismo alla base dell'apoptosi indiretta sembra essere dovuto al rilascio da parte dei macrofagi infetti di particolari sostanze,

come citochine, proteina p25 dell'envelope virale, specie reattive dell'ossigeno (Zimmerman et al., 2006);

2. liberazione di citochine: la secrezione da parte dei macrofagi infetti di TNF-alpha, IL-1 e IL-6 promuove il richiamo e l'attivazione di leucociti, aumenta la permeabilità capillare dando origine ad edema polmonare e broncocostrizione, provoca effetti sistemici come ipertermia, anoressia e letargia (Zimmerman et al., 2006);
3. attivazione di cellule B policlonali: è associata alla comparsa di iperplasia linfoide, di livelli estremamente elevati di immunoglobuline sieriche e di immunocomplessi circolanti (Zimmerman et al., 2006);
4. diminuzione della capacità fagocitaria: i macrofagi infetti manifestano una riduzione della loro capacità di fagocitare i batteri e questo si traduce in una maggiore predisposizione dell'organismo alla setticemia (Zimmerman et al., 2006).

4.4 Risposta immunitaria

Alcuni autori ritengono che la risposta immune contro il PRRSV non sia in grado di risolvere l'infezione, permettendo una viremia lunga e la comparsa dell'infezione persistente nei tessuti linfoidei (Murtaugh et al., 2002). Altri autori però affermano che la tardiva produzione di anticorpi neutralizzanti insieme alla risposta cellulare immune potrebbe eliminare completamente il virus dall'organismo (López e Osorio, 2004).

Un'efficace immagine utilizzata da Molitor et al. nel 1997 raffigura la risposta immunitaria come "un'arma a doppio taglio" per PRRSv. Da una parte il virus predilige le cellule del sistema immunitario, soprattutto i macrofagi, e la malattia clinica può essere ricondotta direttamente a cambiamenti dello stato immunitario dell'ospite: la massiva replicazione in queste cellule è infatti causa di immunosoppressione ed aumentata incidenza di infezioni secondarie. Dall'altra parte l'infezione con PRRSv stimola la formazione di una vasta gamma di anticorpi specifici, distinti l'uno dall'altro strutturalmente e funzionalmente, che proteggono il soggetto da una eventuale reinfezione. In questo modo il sistema immunitario appare intimamente coinvolto sia nella patogenesi della PRRS che nella protezione dalla malattia.

Immunosoppressione

Studi clinici e sperimentali indicano che PRRSV interferisce con la risposta immunitaria dell'ospite e ciò è supportato da due osservazioni: (a) infezioni secondarie, come polmoniti, artriti, infezioni oculari, meningiti ed altre ancora, sono conseguenze comuni dell'infezione da PRRSV; (b) l'infezione sperimentale con stipiti di PRRSV aggrava le manifestazioni cliniche in soggetti inoculati con altri agenti infettivi (Molitor et al., 1997).

In generale i virus agiscono da immunosoppressori:

1. interferendo con la presentazione dell'antigene;
2. inducendo l'apoptosi in cellule coinvolte nella risposta immunitaria;
3. inibendo la produzione delle citochine oppure, al contrario, simulandone l'azione;
4. inibendo il complemento.

La diminuzione del numero dei PAMs, attraverso un meccanismo diretto ed indiretto di apoptosi entro le 24 ore p.i, e la diminuzione della loro capacità di sintetizzare anioni superossido, causa un calo della loro funzione fagocitica e battericida.

A 2 settimane p.i. nelle sottopopolazioni di linfociti T si ha un aumento dei livelli sierici dei linfociti T citotossici/suppressor ($CD8^+$) ed una diminuzione di quelli dei linfociti T helper ($CD4^+$), con un conseguente calo del rapporto $CD4^+/CD8^+$. La riduzione del numero delle cellule $CD4^+$ continua per almeno 14 giorni, mentre le cellule $CD8^+$ raggiungono il loro picco a 28-35 giorni p.i. È ancora sconosciuto però il meccanismo tramite il quale PRRSV riesce ad alterare la composizione della popolazione dei linfociti T, ma si è ipotizzato che il virus possa provocare la morte delle cellule $CD4^+$, con contemporanea stimolazione delle $CD8^+$, oppure agire già a livello di differenziazione intra-timica dei linfociti.

Con l'infezione da PRRSV si ha in particolare una scarsa stimolazione della risposta innata. Analizzando gli effetti di PRRSV sulle citochine, studi sperimentali hanno dimostrato che l'interferone-alpha ($IFN-\alpha$), normalmente prodotto dalle cellule infette da virus, si ritrova, seppure in basse concentrazioni, solo nel siero di suini infetti con PRRSV, e non nelle loro secrezioni polmonari. Anche esperimenti condotti in vitro hanno dimostrato che cellule infette da PRRSV non sono in grado di produrre $IFN-\alpha$. Questo ha portato gli autori a supporre che la produzione di $IFN-\alpha$ nei PAMs e nei monociti del circolo periferico subisca una down-regulation in seguito ad infezione con PRRSV (Drew, 2000; Van Reeth et al., 1999 e 2002; Royae et al., 2004). Conseguenza diretta della riduzione dell'espressione

della citochina è l'assenza di proliferazione delle cellule NK nei tessuti sede d'infezione o nel sangue durante le prime ore p.i. (Lamontagne et al., 2003).

Immunità umorale

Come risultato dell'infezione da PRRSV si producono abbondanti anticorpi specifici rilevabili mediante ELISA e immunoperossidasi in monostrato (IPMA) a 10-14 g.p.i. (Nelson et al., 1994; Labarque et al., 2000; Meier et al., 2003). In particolare, le IgM compaiono 5-7 giorni p.i., raggiungendo il loro picco a 14-21 giorni p.i. (Drew, 2000), e scendono sotto livelli rinvenibili dopo ulteriori 2-3 settimane; le IgG sono invece ritrovabili 7-10 giorni p.i., arrivando ai massimi livelli a circa 4 settimane p.i., rimangono poi costanti per alcuni mesi per abbassarsi infine a livelli minimi a circa 300 giorni p.i. Lo stesso andamento anticorpale si rinviene anche nei liquidi di lavaggio broncheo-alveolare e ciò dimostra che tali anticorpi provengono dal circolo sanguigno (Zimmerman et al., 2006). Queste Ig sono rivolte principalmente verso la proteina N (Yoon et al., 1995) e non sono neutralizzanti, coesistendo con la viremia (Labarque et al., 2000). Gli anticorpi non neutralizzanti potrebbero giocare un ruolo nell'ADE (Antibody-Dependent Enhancement) perché potrebbero esacerbare la replicazione del PRRSV nei macrofagi tanto in vivo come in vitro (Cancel-Tirado et al., 2004). Il fatto che la loro produzione sia abbondante e precoce li rende particolarmente utili a fini diagnostici. In effetti, tanti kit diagnostici in commercio si basano sull'evidenziazione degli anticorpi contro la proteina N, che sono rilevabili dopo 1 settimana p.i. e possono persistere per mesi.

Gli anticorpi neutralizzanti sono rilevabili dalle 4 settimane p.i. in poi, tanto per il genotipo EU come US. L'epitopo principale verso il quale gli anticorpi neutralizzanti sono diretti è la GP5. Altri epitopi meno importanti sono la proteina M, la GP3 e la GP4 (Mateu e Díaz, 2007). Questi anticorpi sono prodotti tardivamente e in quantità ridotta nel corso dell'infezione ma rimangono presenti per lunghi periodi (Yoon et al., 1994; Loemba et al., 1996; Meier et al., 2000 - 2003). Alcuni anticorpi sono diretti anche contro le proteine non strutturali, in particolare contro il polipeptide NSP2; questi anticorpi possono essere utili per le metodiche diagnostiche, mentre le NSP rivestono un ruolo rilevante come target per le cellule T.

In uno studio fatto da Osorio et al. (2002), il trasferimento di anticorpi neutralizzanti a scrofe gravide bloccò l'infezione transplacentare e l'insuccesso riproduttivo. Questo

dimostra che gli anticorpi neutralizzanti sono necessari per prevenire il passaggio del virus al feto, resta però sconosciuto il loro ruolo nell'infezione naturale (Mateu e Díaz, 2007).

Sebbene sia innegabile l'importanza dell'immunità umorale nella resistenza alle reinfezioni e nel limitare la diffusione virale tra i soggetti, il concomitante ritrovamento nel sangue di anticorpi neutralizzanti e di PRRSv suggerisce che i livelli anticorpali normalmente prodotti contro il virus non sono sufficienti a controllarne la replicazione. Inoltre il fatto che i titoli virali raggiungano il loro picco a 7-9 giorni p.i. nei polmoni ed a 4 giorni p.i. nel siero, ossia 2 settimane prima della comparsa degli anticorpi neutralizzanti, conferma che questi ultimi giocano un ruolo secondario nella risposta immunitaria a PRRSv (Zimmerman et al., 2006).

Immunità cellulo-mediata

Una caratteristica saliente della risposta immunitaria a PRRSv è rappresentata dal fatto che la discesa dell'immunità umorale è contemporanea all'aumento di quella cellulo-mediata (Meier et al., 2000).

La proliferazione di linfociti antigene-specifici in risposta a PRRSv inizia, infatti, a 4 settimane p.i. e raggiunge il suo picco a 7 settimane per scemare dopo 11 settimane; una seconda esposizione al virus degli stessi animali a distanza di tempo dalla prima infezione provoca una risposta linfocitaria con un picco maggiore, ma più breve (Molitor et al., 1997). L'azione dei linfociti T è rivolta contro tutte le proteine virali ed è inizialmente debole e transitoria, mentre si consolida 1-2 anni dopo l'infezione (Zimmerman et al., 2006).

Anche la produzione di interferone-gamma (IFN- γ) non è rinvenibile prima di 8-10 settimane p.i.; i livelli di IFN- γ aumentano gradualmente fino a 9-10 mesi e si mantengono elevati per 2 anni p.i. (Meier et al., 2000).

Immunità protettiva

Dati sperimentali e di campo rivelano che suini infetti o vaccinati con PRRSv sono resistenti agli effetti di una nuova esposizione ad uno stipite virale omologo: questo dimostra che l'infezione da PRRSv produce una certa forma di memoria immunitaria che annulla o limita gli effetti di una seconda infezione. È riportato in letteratura che una protezione parziale alla reinfezione da PRRSv esiste anche in soggetti infetti da uno stipite virale eterologo.

Non è ancora chiaro quale sia il ruolo degli anticorpi neutralizzanti e dei linfociti T citotossici nella protezione dalla reinfezione da PRRSv, ma è possibile che l'immunità

protettiva sia affidata ad altri meccanismi, come il cambiamento di sensibilità a PRRSv da parte dei macrofagi. L'infezione polmonare inizia infatti a calare prima della comparsa di un'effettiva risposta immunitaria e si manifesta con una percentuale di PAMs non infetti del 98%: la possibilità che la prevenzione ed il controllo dell'infezione da PRRSv sia associata ad una minor sensibilità dei macrofagi alveolari al virus dimostrerebbe che gli anticorpi neutralizzanti ed i linfociti T giocano un ruolo solo secondario all'interno della risposta immunitaria e limitato all'eliminazione finale del virus (Zimmerman et al., 2006).

Cross-protezione

Data la continua evoluzione di PRRSv, quasi sempre gli stipti vaccinali sono diversi da quelli di campo: questo dimostra come la cross-protezione verso stipti eterologhi del virus rivesta una possibile strategia di controllo dell'infezione. Si osservano però ultimamente sempre più casi di inefficacia vaccinale e questo sta facendo virare verso un controllo basato maggiormente su delle buone misure di biosicurezza.

Studi sperimentali rivelano che i vaccini vivi attenuati sono più efficaci di quelli spenti nel ridurre la gravità della malattia, la durata della viremia, la trasmissione virale e l'incidenza delle infezioni da parte di stipti eterologhi di PRRSv (Zimmerman et al., 2006).

Immunità materna

Non esistono studi specifici circa gli effetti dell'immunità materna sulla sensibilità dei suinetti all'infezione da PRRSv, ma alcune osservazioni indirette indicano che scrofe immuni forniscono alla figliata una certa protezione: gli anticorpi presenti nel colostro sono infatti alle stesse concentrazioni di quelli sierici e le infezioni da PRRSv aumentano nei suinetti non appena cala l'immunità passiva (Zimmerman et al., 2006).

4.5 Infezioni associate

La patogenicità di per sé piuttosto lieve di PRRSv e il suo tropismo per i PAMs hanno spinto numerosi autori a verificare gli effetti di infezioni associate di PRRSv con altri agenti infettivi (Van Reeth, 1997).

Nel 1994 Galina et al. dimostrarono che PRRSv predisponiva all'infezione ed alla malattia causata da *Streptococcus suis*: gli animali sottoposti alla duplice infezione presentavano

infatti un'alta incidenza di meningite e setticemia, mentre quelli inoculati con il solo batterio non mostravano alcun segno clinico.

Nel 1996 Van Reeth et al. si concentrarono sugli effetti causati dall'infezione con PRRSv seguita da quella con *Coronavirus Respiratorio Suino* (PRCv) o con *H1N1-influenzavirus*: risultò che entrambe le infezioni associate provocavano una malattia più grave e un maggior ritardo nella crescita rispetto alle singole infezioni di ogni virus.

Nel 1997 Carvalho et al. studiarono l'infezione secondaria di *Pasteurella multocida* in suini infetti da PRRSv giungendo alla conclusione che "il ruolo di PRRSv come iniziatore di malattie secondarie è ancora indefinito, ma probabilmente lieve".

Anche l'interazione di PRRSv con *Haemophilus parasuis* (Solano et al., 1997) e con *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pol et al., 1997) non portò ad un'accentuazione dei segni clinici.

Infine Thacker et al. nel 2000 dimostrarono che l'infezione con *Mycoplasma hyopneumoniae* aumentava la durata e la gravità della malattia respiratoria sostenuta da PRRSv.

5. SINTOMATOLOGIA

La malattia clinica è principalmente la conseguenza della viremia acuta e della trasmissione transplacentare dell'infezione. L'infezione di PRRS si definisce epidemica quando PRRSv entra in un allevamento immunologicamente vergine e tutti gli animali di tutte le età presentano la malattia; essa diventa endemica invece negli allevamenti in cui gli animali possiedono un'immunità per lo stivite virale infettante (Zimmerman et al., 2006).

5.1 Infezione epidemica

La prima fase dell'infezione epidemica di PRRS dura 2 o più settimane ed è caratterizzata da anoressia e letargia in tutti gli animali, in concomitanza con lo stadio acuto di viremia. Gli animali possono manifestare anche linfopenia, ipertermia con una temperatura rettale di 39-41°C, polipnea e dispnea, macchie iperemiche della cute o cianosi delle estremità.

La seconda fase può iniziare prima che la precedente si concluda per continuare per 1-4 mesi; è caratterizzata da scarse performance riproduttive delle scrofe e da un'alta mortalità pre-svezzamento dei suinetti nati vivi.

Scrofe: la malattia acuta si manifesta soprattutto con un aumento degli aborti (di solito del 2-3%) o della percentuale di ritorni in calore e di scrofe vuote; si osservano anche agalassia, mastite, incoordinazione e esacerbazione di malattie endemiche quali cistite/pielonefrite e rinite atrofica. La mortalità delle scrofe è di solito dell'1-4%, a volte associata a quadri di edema polmonare o di cistite/nefrite, ma sono riportati casi di focolai particolarmente gravi di malattia con una percentuale di aborti del 10-50% e mortalità del 10%. I problemi riproduttivi sono rappresentati da una riduzione della portata al parto e del numero di nati vivi e da un aumento dell'incidenza di parti precoci e del numero di suinetti sottopeso, nati morti e mummificati (Zimmerman et al., 2006).

Verri: oltre ad anoressia, letargia e sintomi respiratori, i verri manifestano un calo della libido ed una riduzione della qualità e del volume del seme, che si traducono in una diminuzione delle dosi di sperma prodotte ogni giorno. Le alterazioni degli spermatozoi sono visibili a 2 settimane dall'infezione e comprendono: ridotta motilità, acrosomi anormali, anomalie morfologiche a carico della testa e del tratto intermedio, presenza di gocce citoplasmatiche prossimali e distali (Prieto e Castro, 2005).

Lattonzoli: sia i suinetti nati prematuri che quelli nati a termine gestazione sono soggetti ad alta mortalità pre-svezzamento (fino al 60%), associata a debolezza, deperimento, diarrea, splay-leg, polipnea e dispnea; meno comuni sono tremori, pedalamento, prominenza della fronte, anemia e trombocitopenia con conseguenti emorragie, aumento di poliartriti e meningiti batteriche (Zimmerman et al.,2006).

Magroni e suini all'ingrasso: l'infezione acuta provoca in questi animali anoressia, letargia iperemia cutanea, polipnea e/o dispnea senza tosse, pelo ispido, riduzione variabile dell'accrescimento giornaliero con una conseguente disomogeneità intragruppo. Anche se solitamente in questa categoria di animali l'infezione singola da PRRSv non comporta elevate percentuali di mortalità, sono riportati in letteratura casi di alta incidenza di malattie endemiche e mortalità del 12-20% (Zimmerman et al., 2006).

5.2 Infezione endemica

Nella maggior parte dei casi, una volta entrato in un allevamento, PRRSv diventa endemico, provocando sintomi clinici solo in sottopopolazioni sensibili, quali i riproduttori da rimonta o i suini svezzati e in accrescimento in cui è scomparsa l'immunità materna. La PRRS endemica si manifesta sottoforma di periodici od occasionali focolai all'interno dell'allevamento e presenta le stesse caratteristiche descritte per la forma epidemica (Zimmerman et al., 2006).

5.3 Fattori condizionanti la manifestazione clinica

Indipendentemente dalle caratteristiche epidemiologiche dell'infezione, sono molti i fattori che ne condizionano la manifestazione clinica: stipite virale, età, predisposizione genetica e stato immunologico dell'ospite, esposizione a lipopolisaccaridi (LPS) batterici, concomitanze con altre patologie (virali e batteriche), gestione aziendale, fattori ambientali, livello immunitario dell'allevamento e altri fattori.

Gli stipiti di PRRSv differiscono geneticamente, antigenicamente e per la gravità delle lesioni provocate a livello respiratorio e riproduttore. Stipiti a bassa virulenza possono dar luogo ad infezioni completamente subcliniche, mentre stipiti molto virulenti provocano sintomatologie di diversa gravità in funzione dello stato immunologico dell'allevamento.

Gli LPS batterici o endotossine costituiscono la maggior componente della parete batterica e sono stati rinvenuti ad alte concentrazioni nella polvere in allevamenti scarsamente ventilati. Prove sperimentali hanno dimostrato che la somministrazione intratracheale di LPS a suini infetti con PRRSv provoca una malattia respiratoria più grave di quella data dai soli LPS o PRRSv.

Inoltre, come già descritto nel capitolo precedente, PRRSv rende gli animali infetti più sensibili ad alcune malattie batteriche e virali ed ha un effetto additivo e sinergico nei confronti di altri agenti infettivi, come *Bordetella bronchiseptica* e *Salmonella choleraesuis*. Infine, anche il management ha una notevole influenza sulla gravità della malattia: il *pig-flow* (cfr. par. 5.2.6), la regolazione della temperatura e della ventilazione, le caratteristiche delle strutture, la provenienza ed il benessere degli animali sono solo alcuni dei fattori che possono favorire o limitare l'infezione (Zimmerman et al., 2006).

5.4 Lesioni

Le lesioni macro- e micro-scopiche più evidenti si osservano negli animali giovani tra i 4 e i 28 giorni p.i. e sono localizzate soprattutto in polmoni e linfonodi, ovvero i siti di maggior replicazione virale; successivamente si possono rilevare reperti microscopici a livello di rene, cervello, cuore e di altri organi e tessuti colpiti in minor misura dal virus (Zimmerman et al., 2006).

Polmoni: presentano una polmonite interstiziale anche grave, specialmente 10-14 giorni p.i., con aree focali o diffuse di atelettasia e consolidamento; il parenchima appare compatto e gommoso, non collassato, molto umido e di colore rosso-tannino. Lo sviluppo del consolidamento polmonare sembra essere correlato alla virulenza dello stipite virale a cui il soggetto è esposto (Mengeling e Lager, 2000). Microscopicamente i setti alveolari sono dilatati a causa dell'infiltrazione di macrofagi, linfociti e plasmacellule e per l'iperplasia dei pneumociti di tipo-II; gli alveoli possono contenere macrofagi, detriti cellulari e liquido sieroso, mentre linfociti e plasmacellule formano dei manicotti intorno alle vie aeree e ai vasi. Se non ci sono complicazioni dovute ad infezioni concomitanti, le lesioni vanno incontro a risoluzione 4 settimane dopo l'esposizione al virus (Zimmerman et al., 2006).

Linfonodi: si presentano edematosi, moderatamente duri, di colore grigio o marrone chiaro e 2-10 volte più grandi del normale; tale linfoadenomegalia può durare più di 6 settimane

(Mengeling e Lager, 2000). Lesioni microscopiche sono rappresentate da iperplasia follicolare, necrosi e svuotamento dei centri germinali e piccole dilatazioni cistiche della corticale.

Cervello, cervelletto e tronco cerebrale: possono manifestare una modesta leucoencefalite linfocitica a partire da 7 giorni p.i.

Cuore: dal 9° giorno p.i. possono svilupparsi vasculiti linfocitiche multifocali da lievi a moderate e miocarditi perivascolari.

Reni: presentano occasionalmente aggregati linfocitici periglomerulari e peritubulari di lieve entità, accompagnati da vasculiti segmentali moderate o gravi concentrate nella pelvi e nella midollare. I vasi colpiti mostrano un endotelio spesso, una concentrazione di liquido proteinaceo nel subendotelio e manicotti perivascolari di linfociti e macrofagi.

Mucosa nasale: già a 12 ore dall'inoculazione del virus l'epitelio può mostrare ciglia agglomerate od assenti, ipertrofia o perdita cellulare e metaplasia squamosa.

Utero: miometrio ed endometrio sono edematosi e presentano manicotti perivascolari linfoistiocitici; si possono notare anche vasculiti segmentali e microseparazioni tra l'epitelio endometriale ed i trofoblasti placentali.

Testicoli: a 7-25 giorni p.i. è osservabile un'atrofia dei tubuli seminiferi con comparsa di cellule giganti multinucleate ed apoptosi delle cellule germinali.

Feti: gli animali nati morti o mummificati sono in genere ricoperti da uno strato denso e marrone di meconio e liquido amniotico. A livello macroscopico: edema della capsula renale, del mesentere e del legamento splenico, ascite, idrotorace ed idroperitoneo. Inoltre ai fini della diagnosi di PRRS è utile il ritrovamento in suinetti nati morti o sottopeso di emorragie segmentali e gonfiore a livello del cordone ombelicale (Mengeling e Lager, 2000; Zimmerman et al., 2006)

6. DIAGNOSI

Un'infezione da PRRSv può essere diagnosticata sulla base di (Zimmerman et al., 2006):

1. informazioni soggettive: storia dell'allevamento, segni clinici, lesioni anatomo-patologiche;
2. informazioni oggettive: risultati produttivi dell'azienda, isolamento del virus, sierologia.

6.1 Diagnosi clinica ed anatomo-patologica

La diagnosi della PRRS è complessa perché la sintomatologia è compatibile a tante altre malattie. Il sospetto di un focolaio di PRRS all'interno di un allevamento nasce solitamente quando si osservano problemi riproduttivi nelle scrofe e malattie respiratorie nei suini d'ogni età (Zimmerman et al., 2006). I dati produttivi degli allevamenti con un'infezione da PRRSv in atto rivelano spesso un aumento dei casi di aborto o di parto precoce e del numero di suinetti nati morti o sottopeso, mentre si può registrare un moderato calo dei tassi di crescita giornaliera e degli indici di conversione alimentare (Mengeling e Lager, 2000). Le lesioni macroscopiche non sono patognomiche e spesso sono mascherate da quelle causate da altri patogeni. Per tutte queste ed altre ragioni è necessario eseguire una diagnosi differenziale con altri patogeni: Parvovirus Suino, Aujeszky, PCV2, encefalomielite emoagglutinante (HEV), Enterovirus Suino, Influenza Suina, Peste Suina Classica, Citomegalovirus Suino e Leptosirosi (Yoon et al., 2003; Zimmerman et al., 2006). La conferma della diagnosi ha bisogno del rilevamento del materiale genomico virale, di anticorpi specifici nel siero o nei liquidi fetali o dell'isolamento virale dai soggetti clinicamente sospetti (Bøtner, 1997).

6.2 Diagnosi virologica

La presenza di PRRSv può essere dimostrata attraverso: (a) l'isolamento del virus in colture cellulari, (b) l'identificazione diretta di antigeni virali in sezioni di tessuto o (c) la ricerca di RNA virale (Bøtner, 1997).

I campioni per l'isolamento del virus e per la ricerca di RNA virale devono essere refrigerati a 4°C dopo la loro raccolta, poiché il congelamento degrada l'RNA, ed inviati ai laboratori

diagnostici entro 2 giorni. Inoltre, dato che il virus viene facilmente alterato dal calore e da valori di pH al di fuori del suo ristretto range, devono essere assicurati l'assoluta sterilità dei campioni per evitare cambiamenti di pH dovuti alla contaminazione batterica e l'impiego esclusivo di tessuti freschi (Zimmerman et al., 2006).

Isolamento virale

L'isolamento virale (IV) è il test più utilizzato per la ricerca di PRRSv e, nella maggior parte dei casi, rappresenta anche il test d'elezione per confermarne la presenza (Mengeling e Lager, 2000).

Le prove di isolamento vengono effettuate su colture cellulari costituite da PAMs, più sensibili a PRRSv, o da cellule derivate dal rene di scimmia africana (linea cellulare MA-104). Poiché non tutti gli stipiti virali riescono a replicare in entrambe le linee cellulari, è comunque preferibile, quando possibile, utilizzare almeno due tipi di colture diverse per l'effettuazione di questa prova (Dewey et al., 2000; Yoon et al., 2003).

I risultati si possono ottenere già entro un giorno dall'inoculazione delle colture, ma a volte sono necessarie alcune settimane, in relazione ai diversi titoli virali presenti nei campioni sottoposti ad esame.

La ricerca di PRRSv può essere eseguita anche in colture primarie di PAMs ottenute dal lavaggio dei polmoni di suini infetti, sia *intra-vitam* che in sede autoptica.

Gli organi d'elezione per l'isolamento sono siero, polmoni, linfonodi e tonsille raccolti tra i 4 ed i 28 giorni p.i.; gli stessi campioni sono consigliati anche in caso di aborto tardivo o parto precoce, soltanto se ottenuti da soggetti nati vivi, poiché nei nati morti e nei mummificati si verificano processi autolitici che diminuiscono la sopravvivenza virale. Per le infezioni persistenti invece i campioni migliori sono dati da tonsille, linfonodi e raschiati faringei piuttosto che da siero e polmoni (Zimmerman et al., 2006).

Un discorso a parte merita infine lo sperma: infatti, a causa della tossicità del seme a livello cellulare, la ricerca di PRRSv in tale matrice viene eseguita soltanto mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) od inoculando soggetti sensibili con il campione in esame (Mengeling e Lager, 2000).

Ricerca di antigeni virali

L'immunoistochimica (IHC) e l'immunofluorescenza (IF) sono utilizzate per ricercare antigeni del nucleocapside di PRRSV nel citoplasma di cellule provenienti da tessuti di suini infetti. In particolare, polmoni, cuore, rene, linfonodi, milza, timo e tonsille sono tipicamente utilizzate per l'IHC, mentre per l'IF il tessuto d'elezione è rappresentato dai polmoni.

L'IHC è più sensibile dell'IF e può utilizzare tessuti fissati in formalina; l'IF, d'altra parte, è più veloce e più economica, ma necessita esclusivamente di tessuti freschi (Zimmerman et al., 2006).

L'impiego di entrambe le metodiche nei laboratori diagnostici è tuttavia limitato a causa del livello di preparazione degli operatori necessario per ottenere dei risultati soddisfacenti e dell'esperienza richiesta per interpretarli (Mengeling e Lager, 2000).

Ricerca dell'acido nucleico virale

La Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) e le sue varianti come la Real Time RT-PCR quantitativa e la Nested PCR, sono utilizzate per ricercare l'acido nucleico virale in omogeneizzati tissutali, siero, seme, scarificati dell'orofaringe e fluidi di lavaggio polmonare. Mentre l'IV amplifica gli interi virioni infettanti, la RT-PCR converte l'RNA virale in cDNA tramite l'enzima *trascrittasi inversa* e successivamente esegue un'amplificazione esponenziale del cDNA ottenuto fino a livelli rinvenibili.

I vantaggi offerti dalla RT PCR rispetto a IV, IHC e IF sono dati da:

1. sensibilità e specificità più alte;
2. ritrovamento di RNA virale in soggetti con infezione sia acuta che persistente;
3. ritrovamento di RNA virale in tessuti autolitici o tossici per le colture cellulari, come seme e feci;
4. tempi di risposta rapidi, con risultati ottenibili in 1-3 giorni;
5. possibilità di effettuare il sequenziamento del genoma virale e, quindi, maggior utilità della metodica diagnostica.

Il principale svantaggio della RT PCR è invece rappresentato dall'impossibilità di distinguere i virus infettanti da quelli non infettanti.

Le prestazioni del test possono variare da un laboratorio a un altro in funzione della tipologia di PCR e della tecnica utilizzata per amplificare e ricercare il genoma virale. Ad

esempio, un procedimento molto abituale in laboratorio è di processare diversi campioni in pool. In questo caso la dimensione del pool deve essere calibrata in modo da assicurare la positività del risultato anche in presenza di un solo campione infetto nel pool. Si deve prestare particolare attenzione al disegno dei primers e al frammento di RNA da rilevare, per la grande variabilità che questo virus presenta. L'ORF5 è infatti molto variabile tra i diversi stipiti virali ed esiste una vasta banca-dati per permettere il confronto delle varie sequenze genomiche, gli ORF 6 e 7 sono i più indicati per fare la diagnosi perché sono i più conservati.

Il sequenziamento è utile per (Zimmerman et al., 2006):

1. determinare se la ricomparsa della PRRS in un'azienda è dovuta al riemergere di uno stipite virale preesistente o all'entrata di uno nuovo;
2. stabilire se i focolai di PRRS in un allevamento sono provocati da uno o più stipiti virali;
3. tracciare la possibile origine dell'introduzione di PRRSv nell'intera filiera suinicola;
4. monitorare la diffusione del virus all'interno o tra le aziende;
5. differenziare gli stipiti vaccinali da quelli di campo.

Secondo quanto riportato in letteratura, l'RNA di PRRSV è ritrovabile fino a 86 giorni p.i. nei linfonodi, 92 giorni nel siero, 105 giorni nei raschiati dell'orofaringe, 251 giorni negli omogeneizzati di siero e tonsille (Zimmerman et al., 2006).

6.3 Diagnosi sierologica

La diagnosi sierologica è ancora preferita da molti laboratori, poiché il siero permette di ottenere facilmente quantità di campioni che consentono l'esecuzione di test multipli e può essere conservato agevolmente per realizzare esami anche a distanza di tempo dal prelievo. La dimostrazione di una sieroconversione, da negativo a positivo, o l'aumento dei titoli anticorpali specifici in un gruppo di animali indicano la presenza di un'infezione da PRRSv. D'altro canto, la sierologia da sola non rappresenta un ottimale approccio diagnostico negli allevamenti con infezioni pregresse o in cui si pratica la vaccinazione per PRRS, poiché le metodiche sierologiche in uso non permettono di distinguere gli anticorpi prodotti in risposta ad una infezione iniziale, ad una reinfezione o ad una vaccinazione. Sulla base delle osservazioni appena fatte, considerata l'alta prevalenza di PRRSv negli allevamenti, un unico risultato sierologico positivo non dimostra un ruolo causale del virus nella diagnosi

clinica. Ciò è altrettanto vero nel ritrovamento di anticorpi in suinetti sottoscrofa o in svezzamento: questo, infatti, può derivare dalla presenza dell'immunità materna, che può permanere fino a 4 settimane.

Cinque sono i test sierologici utilizzati per ricercare gli anticorpi anti-PRRSv: l'immunofluorescenza indiretta (IFI), l'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), la blocking ELISA, la sieroneutralizzazione virale (SN) e l'ImmunoPeroxidase Monolayer Assay (IPMA).

L'IFI ritrova le IgM e le IgG specifiche contro PRRSv già a 5 e 9-14 giorni p.i., rispettivamente; la sensibilità del test dipende dalle capacità del personale tecnico e dalle differenze antigeniche tra lo stipite virale utilizzato e quello di campo. Questa metodica viene impiegata di solito per confermare un risultato sospetto positivo all'ELISA.

I kit commerciali dell'ELISA rappresentano il "gold standard" per la ricerca di anticorpi anti-PRRSv: la tecnica è infatti sensibile, specifica, standardizzata e rapida.

La maggior parte degli ELISA commerciali sono rivolti verso la proteina N, perché conservata tanto per il genotipo EU come US.

Sul mercato sono presenti svariati tipi di kit ELISA per rispondere ai fabbisogni diagnostici: (a) competitivi ed indiretti; (b) in grado di distinguere gli anticorpi verso il ceppo EU e US; (c) per differenziare infezioni recenti da precedenti attraverso il rilevamento di anticorpi IgM e IgG. La presenza di questi anticorpi è determinata dalla valutazione del rapporto tra la reazione del campione in esame e quella del controllo positivo (S/P). Il campione è considerato positivo con cut-off di $S/P \geq 0,40$. Interpretare i risultati dell'ELISA in seguito a singoli campioni prelevati una sola volta può essere difficoltoso. Un esito negativo di un campione può infatti significare che il soggetto in esame:

1. non è infetto;
2. presenta un'infezione acuta e non ha ancora sierconvertito;
3. è persistentemente infetto ma è diventato sieronegativo;
4. ha eliminato l'infezione ed è tornato sieronegativo;
5. risulta negativo a causa della scarsa sensibilità del test.

Per ovviare a questi problemi interpretativi è utile associare alla diagnosi sierologica quella eziologica.

Vengono riportati inoltre risultati falsi positivi nello 1-3% dei campioni (Keay et al., 2002): quando si tratta di aziende indenni che possono perdere il loro status per un falso positivo nei casi sospetti IFI, blocking ELISA, IPMA e SN sono utilizzate come test di conferma.. (Keay et al., 2002; Ferrin et al., 2004).

Tra i veterinari liberi professionisti si ritiene che ci sia correlazione tra il valore S/P dell'ELISA Idexx e il momento o lo stato dell'infezione: più alto è il valore S/P, più recente è stata l'infezione. Quest'ipotesi è stata rifiutata da Cuartero et al. (2002) che non ha trovato una relazione tra il valore S/P e il momento della viremia in un gruppo di suinetti svezzati durante un focolaio acuto da PRRS.

La SN ricerca gli anticorpi capaci di neutralizzare una quota costante di PRRSv in una coltura cellulare, fornendo così una misura plausibile dell'immunità protettiva. Il test è altamente specifico, ma gli anticorpi neutralizzanti non si formano prima di 1-2 mesi p.i.: la sensibilità di questa metodica è perciò minore rispetto a quelle dell'IFA e dell'ELISA (Zimmerman et al., 2006).

L'IPMA infine usa come supporto antigenico colture primarie di PAMs o derivati della linea cellulare MA-104, infette con un virus di referenza; su queste colture previamente fissate si aggiunge il siero campione ed un coniugato antisuino marcato con perossidasi. È una tecnica molto specifica, ma poco sensibile, laboriosa e a volte complessa da interpretare.

7. PREVENZIONE E CONTROLLO

La rapida ed imponente diffusione di PRRSv ha ben presto richiesto l'elaborazione di strategie di controllo e la conoscenza in maniera più approfondita dell'agente infettivo. Nel 1996 in Danimarca si effettuò uno dei primi piani di controllo della PRRS mediante l'uso di un vaccino vivo attenuato (Bøtner et al., 1999). L'obiettivo della vaccinazione è di stimolare una risposta immunitaria che possa proteggere verso la forma clinica della malattia; la vaccinazione però non è in grado d'impedire l'infezione. I vaccini non sono stati così efficaci come ci si aspettava; non riescono infatti a conferire una protezione completa verso la malattia. Il PRRSV, sia come vaccino vivo attenuato (MLV) sia il ceppo di campo, induce bassi livelli d'immunità cellulo-mediata e gli anticorpi neutralizzanti sono prodotti tardivamente (Meier et al., 2003). Per di più, la variabilità genomica che caratterizza il PRRSV sembra limitare l'efficacia dei vaccini (Labarque et al., 2004) anche se è stato dimostrato un certo livello di cross-protezione (Mengeling et al., 2003a - 2003b; Martelli et al., 2007).

In assenza di vaccini realmente validi, soltanto la cooperazione di tutte le componenti del comparto suinicolo ed il regolare monitoraggio sierologico degli animali per studiare l'evoluzione dell'infezione nelle aziende permettono di gettare le basi per una futura eradicazione della PRRS (Le Potier et al., 1997).

7.1 Prevenzione

Per prevenire l'ingresso in azienda di un ceppo esterno di PRRSV si devono mettere in atto rigorose misure di biosicurezza.

In condizioni ideali la biosicurezza ha inizio già con la costruzione dell'allevamento in un'area isolata, ma al di là della localizzazione, particolare attenzione va rivolta a tutte le movimentazioni verso l'interno e l'esterno dell'azienda, comprese quelle di animali, personale, materiali vari, liquame, mangime ed acqua. Poiché PRRSv resiste in condizioni di basse temperature ed elevata umidità, tutto il materiale utilizzato in azienda o per il trasporto degli animali deve essere pulito ed asciugato; ogni allevatore dovrebbe inoltre impedire l'entrata in azienda di animali selvatici, come roditori, insetti ed uccelli. Negli

USA il timore della trasmissione per via aerogena in zone ad elevata densità suinicola ha portato all'adozione di sistemi di filtrazione molto specializzati (Dee et al., 2006).

I riproduttori che entrano in un'azienda negativa a PRRS devono provenire da centri riconosciuti negativi attraverso campionamenti ufficiali, gli animali da rimonta dovrebbero essere mantenuti in strutture adibite a quarantena per un periodo di tempo non inferiore ai 30 giorni e quindi testati prima dell'introduzione in allevamento.

Infine, anche il seme deve provenire da centri genetici PRRSv-negativi che regolarmente provvedano a monitorare siero e sperma attraverso la ricerca del virus mediante PCR (Zimmerman et al., 2006).

7.2 Controllo

Come descritto in precedenza, il controllo della PRRS assume un valore fondamentale nel tentativo di limitare gli effetti dell'infezione nelle varie fasi di produzione.

Negli allevamenti da riproduzione con infezioni endemiche la circolazione di PRRSv è resa possibile dal fatto che, in qualsiasi momento, gli animali si trovano in diversi stadi di infezione ed immunità. In tale situazione, il primo passo per interrompere il ricircolo virale è dato dall'utilizzo di riproduttori che siano stati esposti all'infezione ed abbiano sviluppato un'efficace risposta immunitaria prima di entrare in produzione (Zimmerman et al., 2006).

Acclimatamento

La rimonta delle scrofette rappresenta la chiave per controllare la PRRS: un costante acclimatamento delle partite dei riproduttori determina infatti la stabilizzazione dei segni clinici, il miglioramento dei parametri riproduttivi e la produzione di suini negativi a PRRSv al momento dello svezzamento (Zimmerman et al., 2006).

È stato da tempo dimostrato che l'introduzione di scrofette immunologicamente vergini in un'azienda infetta provoca episodi ricorrenti di problemi riproduttivi; d'altra parte, l'entrata di animali viremici può sottoporre l'intera popolazione dell'allevamento ad una continua esposizione ad alti livelli di virus (Dee e Joo, 1997).

Appare allora evidente l'importanza di esporre a PRRSv le scrofette da rimonta sieronegative in un apposito reparto di acclimatamento o isolamento, dove possano contrarre l'infezione. Esse possono, quindi, essere immesse in produzione solo dopo averne accertato

tramite test sierologici lo sviluppo dell'immunità e l'eliminazione della viremia, in modo che non costituiscano una fonte di virus per gli altri animali.

Esistono diversi sistemi di acclimatamento: in alcuni, suinetti svezzati od animali di scarto vengono posti a contatto con le scrofette per fungere da "untori". Tuttavia, con il passare del tempo, l'allevamento tende a divenire immune per PRRSv e la trasmissione virale al suo interno cessa, mentre aumenta la produzione di suini svezzati negativi (Zimmerman et al., 2006). L'infezione naturale delle scrofette può perciò risultare difficoltosa ed è quindi importante accertarsi che gli animali adibiti ad "untori" siano effettivamente viremici (Andreasen, 2000). Questo è associabile ad ulteriori sistemi di infezione, come favorire l'esposizione al virus tramite il contatto con nati morti, placente o feci di animali infetti, utilizzare prodotti vaccinali od inoculare il siero di animali viremici.

In particolare, l'inoculazione degli animali da rimonta con il siero di soggetti viremici della stessa azienda è un espediente sempre più utilizzato tra gli allevatori, a causa della constatazione che i vaccini commerciali non forniscono una sufficiente cross-protezione nei confronti del sempre maggiore numero di stipiti virali circolanti. Questa sorta di esposizione programmata a PRRSv sembra accorciare la durata della manifestazione clinica, ma presenta numerosi rischi e richiede un'applicazione attenta ed un'elevata qualità delle norme di controllo (Zimmerman et al., 2006).

Management degli animali in accrescimento

Il ciclo di trasmissione di PRRSv all'interno del reparto svezzamento o di ingrasso è mantenuto dal contatto, anche indiretto, tra i soggetti infetti meno giovani e quelli invece siero-negativi che entrano in tali reparti ogni settimana. La constatazione che eliminando gli animali viremici si può interrompere questo ricircolo virale ha permesso di pianificare una nuova strategia di controllo, denominata "*spopolamento parziale*" (Dee e Joo, 1997). Questa consiste nello spostare per alcune settimane i suinetti svezzati in strutture regolate da uno stretto regime di "tutto vuoto/tutto pieno" (TVTP), poste al di fuori del reparto svezzamento o, se possibile, dell'azienda stessa. Lo "spopolamento parziale" ha mostrato nel tempo risultati significativi, come l'aumento dei tassi di crescita ed il calo della mortalità; tuttavia presenta ancora degli aspetti limitanti, come la difficoltà di svuotare reparti di svezzamento ampi e di trovare strutture capaci di contenere tutti gli animali durante il periodo di

disinfezione od ancora, la necessità di ripetere questo protocollo periodicamente per mantenere i risultati raggiunti.

Nelle situazioni in cui anche i suinetti sottoscrofa presentano infezioni acute da PRRSv, è richiesta l'applicazione di ulteriori strategie manageriali come il limitare gli spostamenti degli animali tra le covate nelle prime 24 ore di vita, eliminare i soggetti persistentemente infetti prima dello svezzamento e mantenere un rigido sistema di TVTP nel reparto svezzamento (Zimmerman et al., 2006).

7.3 Eradicazione

In una realtà come quella italiana, in cui manca un piano nazionale di controllo, le strategie di eradicazione non sono di certo attuabili. La presenza di notevoli differenze ambientali e l'assenza di garanzie per l'intero settore zootecnico fanno sì che venga affidata alla capacità ed alle motivazioni di ciascun allevatore la responsabilità del controllo dell'infezione in ogni singola azienda. Negli ultimi anni, alcune realtà suinicole hanno compiuto passi importanti nel definire protocolli in grado di eliminare PRRSv dalle aziende infette (Andreasen, 2000; Dee et al., 2000; Blanquefort e Benoit, 2000). L'eradicazione della PRRS negli allevamenti da riproduzione necessita inevitabilmente di strategie di controllo efficaci, con l'obiettivo di ottenere una popolazione immune e PRRSv-free, e di rigide misure di biosicurezza volte ad impedire l'entrata di una nuova infezione in azienda.

Le strategie per eradicare la PRRS sono:

- spopolamento/ripopolamento totale: tecnica molto efficace, ma estremamente costosa e giustificabile soltanto se si desidera la contemporanea eliminazione di malattie concomitanti.
- spopolamento parziale: indicato per l'eliminazione del virus nei soggetti in accrescimento, quando la trasmissione a livello dei riproduttori è già terminata; questa tecnica è sufficiente per l'eradicazione dell'infezione in aziende piccole, mentre in quelle con più di 500 scrofe richiede l'associazione di strategie aggiuntive (Zimmerman et al., 2006).
- segregated early weaning (SEW): utilizzato per produrre animali indenni da PRRSv da scrofe infette e consiste nel separare sale parto, settore svezzamento ed ingrasso in tre siti distinti e lontani tra loro alcuni km, gestiti secondo il sistema TVTP; i suinetti

vengono svezzati tra i 5 e i 14 giorni di vita, ovvero prima della scomparsa dell'immunità materna e prima di una possibile infezione con gli agenti infettivi della madre (Bertacchini e Campani, 2001).

- test-and-removal (T&R): si prelevano campioni di siero da tutte le scrofe in produzione; con l'ausilio di ELISA e PCR si ricercano anticorpi anti-PRRSv e virus e si eliminano gli animali risultati positivi ad almeno uno dei due test (Dee et al., 2000); questa tecnica può essere utilizzata dagli allevamenti che adottano il SEW, da quelli in cui non si osservano episodi clinici di PRRS da più di 12 mesi e da quelli con una prevalenza stimata inferiore al 25% ed in cui non ci sono indicazioni di una circolazione virale nei riproduttori.
- chiusura dell'allevamento: basata sul fatto che PRRS non può resistere in una popolazione immune; questa strategia consiste nell'espore all'infezione tutti gli animali presenti e nel bloccare l'entrata dei soggetti da rimonta finché persiste il rischio di una loro esposizione al virus. Tale periodo non dovrebbe essere inferiore a 6 mesi, ma sono possibili delle variazioni in funzione dello status sierologico dell'azienda e dell'efficienza del *pig flow* (Zimmerman et al., 2006).

PARTE SPERIMENTALE

8. SCOPO DELLA TESI

La PRRS attualmente è una delle virosi di maggior impatto economico per la zootecnica suinicola: basti pensare che i danni economici causati dalla malattia nell'industria suinicola statunitense sono stati calcolati in 560 milioni di dollari l'anno (Neumann et al., 2005; Pitkin et al., 2008). La grande variabilità nella biologia di questo virus e nella sua epidemiologia ha reso difficile la messa a punto di efficaci strumenti di profilassi indiretta ed ha costretto allevatori e veterinari a mettere a punto strategie di controllo a più livelli, con l'obiettivo di convivere con l'infezione minimizzando i danni diretti ed indiretti da questa provocati. Negli ultimi anni una malattia virale emergente ha sottratto il ruolo di protagonista alla PRRS: il Circovirus suino tipo 2 (PCV2). La comparsa nel mercato di vaccini efficaci contro il PCV2 ha nuovamente fatto diventare la PRRS la malattia più importante da sconfiggere. Oggi di fatto i metodi d'elezione per tenere sotto controllo l'andamento immunitario e virale sono l'ELISA (per l'evidenziazione degli anticorpi) e la PCR classica o realtime (per l'individuazione del virus).

In questo contesto si inserisce questo studio sperimentale, sviluppato all'interno della "ricerca corrente 2007", progetto IZS VE 04/07 RC, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, in cui l'Università degli Studi di Padova è stata coinvolta come unità operativa relativamente alla parte di indagine biomolecolare e alla conduzione dell'infezione sperimentale di campo.

Oltre alla messa punto e validazione di una metodica biomolecolare valida per la qualificazione e quantificazione dei titoli virali (una RT-PCR RealTime Sybr Green e una RT-PCR RealTime One Step con sonda specifica home-made), verranno analizzati i dati diagnostici ottenuti dai campioni su diverse matrici ottenuti in corso di una infezione sperimentale, per saggiare la validità diagnostica delle metodiche stesse.

9. MATERIALI E METODI

Dato l'interesse notevole suscitato dalla malattia, a livello commerciale si è reso disponibile un ampio ventaglio di kit commerciali (tra l'altro in continua evoluzione), sia a livello sierologico che biomolecolare, oltre a svariate reazioni home-made sviluppate in laboratori diversi. La disponibilità di questi diversi prodotti e la variabilità di PRRSv rendono opportuno un lavoro di verifica volto a meglio caratterizzare la loro attendibilità diagnostica. Un aspetto applicativo importante potrebbe essere nell'ambito di programmi di acclimatamento di scrofette da rimonta per verificarne lo status sanitario al momento del loro arrivo in azienda, durante il percorso di acclimatamento e al momento della loro messa in produzione.

Per quanto riguarda la validazione, questa è stata condotta su 4 metodi di PCR, di cui uno commerciale (RealTime) e tre desunti da pubblicazioni scientifiche e sviluppati home-made. Il gruppo di ricercatori dell'IZS ha validato le metodiche RT-PCR classica two steps e RT-PCR RealTime COMMERCIALE, per le cui caratteristiche tecniche si rimanda all'**Appendix 1 e 2**.

Il gruppo di malattie infettive della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova ha validato le metodiche RT-PCR RealTime Sybr Green e RT-PCR RealTime con sonda (HighConfidence / HighSensitivity), le cui caratteristiche tecniche vengono trattate di seguito nel capitolo relativo alle metodiche utilizzate.

I campioni raccolti durante questo studio provengono da un'infezione sperimentale effettuata in un allevamento suinicolo da riproduzione a ciclo aperto con infezione endemica di PRRSv. Il controllo di PRRS in quest'azienda è perseguito con acclimatamento lungo delle scrofette da rimonta (al loro arrivo siero negative e di circa 6 kg di peso) ed adozione di rigide misure di biosicurezza interna ed esterna.

9.1 Infezione sperimentale

Come precedentemente già descritto, l'infezione sperimentale si è svolta in quattro differenti fasi:

Preparazione del virus per l'inoculo

Il virus adoperato per l'infezione sperimentale è stato quello circolante in allevamento (appartenente al ceppo europeo). Per ottenere una sufficiente quantità di virus, due giorni prima dell'infezione è stato prelevato il sangue dalla giugulare di 10 suinetti dai gruppi di 6-7 settimane di vita, scelti a caso (e contrassegnati in modo da poterli identificare successivamente) con sintomi ascrivibili a infezione da PRRSv. Il sangue è stato portato in laboratorio e immediatamente eseguita una RT-PCR SybrGreen per selezionare i capi fonte di virus per l'infezione. I soggetti migliori per questo scopo sono stati due, scelti sulla base dei valori di CT più bassi e verificata la temperatura di Melting. Il giorno successivo, antecedente a quello dell'infezione, è stato quindi eseguito il salasso degli animali selezionati ottenendo circa 120-130 ml in totale immediatamente portato in laboratorio per ottenere il siero da inoculare per l'infezione. Una provetta dello stesso siero è stata contemporaneamente inviata all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna per effettuare una RT-PCR quantitativa (metodo di prova NK 2B52) con lo scopo di conoscere il titolo virale dell'inoculo per l'infezione.

In laboratorio è stata effettuata la separazione del coagulo in centrifuga (10 minuti a 850 giri/minuto) con aggiunta di 5 mg/l di gentamicina per prevenire la crescita batterica e conservazione a +4° C fino al momento dell'inoculo.

Infezione

Il giorno successivo all'ottenimento del siero per l'inoculo si è proceduto all'infezione sperimentale in campo. Sono state scelte 12 scrofette da rimonta di 6-7 kg e 3-4 settimane di vita, arrivate in allevamento il pomeriggio precedente e provenienti da centro genetico PRRS free. Gli animali sono stati marcati con marca auricolare numerata da 1 a 12 e stabulati in una stanza dedicata in un unico box. 10 soggetti sono stati seguiti per tutto il corso dell'infezione, 2 sono stati sacrificati durante l'esperimento ai giorni 10 e 30 post infezione per ottenere materiale per le operazioni di ring-test del IZS-VE.

Le scrofette sono state infettate con un inoculo di 2ml per via intranasale (1 ml per narice) e altri 2ml intramuscolo. 5 animali appartenenti allo stesso gruppo di origine sono stati usati come controllo negativo dai quali sono stati prelevati 1 campione per matrice diagnostica (5 sieri, 5 tamponi nasali, 5 tamponi orali e 5 tamponi auricolari).

Campionamento

Ai giorni 0, 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 76 post infezione sono stati eseguiti i campioni di sangue da giugulare e utilizzando 2 tamponi per ogni matrice, sterili e inclusi in 2ml di PBS antibiotato (tampone nasale, tampone salivare e tampone di goccia di sangue dalla vena auricolare, approssimativamente 100-150 μ l). In totale tra tutte le matrici sono stati ottenuti 528 campioni derivanti dall'infezione sperimentale e stoccati a -80° C in attesa del loro utilizzo.

È da segnalare che a parte gli animali 8 e 3, sacrificati a 10 e 30 GPI rispettivamente, il giorno 35 l'animale 1 non è stato possibile prelevarlo causa intervento correttivo di prolasso del retto.

Analisi

Una volta terminati tutti i campionamenti previsti in corso di infezione le aliquote stoccate a -80° C sono state estratte e analizzate.

Precedentemente alle analisi è stata condotta la validazione delle 2 metodiche di RealTime RT-PCR presso il laboratorio del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova.

9.2 Metodiche biomolecolari

Nel corso delle prove di validazione e delle analisi dei campioni sono stati utilizzati il termociclatore Real-Time LightCycler480 – Roche e lo spettrofotometro Nanodrop ND-1000.

I reagenti, le soluzioni e i kit utilizzati per la preparazione dei campioni sono stati:

- Acqua bidistillata, conservata a temperatura ambiente;
- Kit per l'estrazione RNA, clonaggio e purificazione degli ampliconi riportati qui di seguito in **tabella n. 1**; i reagenti forniti con i kit si conservano a temperatura ambiente ad eccezione del PolyA e della DNasi I, da conservare in frigorifero a $+4^{\circ}$ C ($\pm 3^{\circ}$ C), se in forma liofilizzata o in congelatore a -20° C ($\pm 10^{\circ}$ C), se ricostituito e aliquotato (secondo le istruzioni annesse), non oltre la data di scadenza. Fanno eccezione la DNasi, che una volta ricostituita va conservata tra -15° C e -25° C, e le cellule competenti per il clonaggio, che si conservano a -80° C.

KIT PER L'ESTRAZIONE RNA, CLONAGGIO E PURIFICAZIONE DEGLI AMPLICONI	
KIT	OPERAZIONE
High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics)	Estrazione RNA da organi
High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics)	Estrazione RNA da sieri
High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics)	Estrazione RNA da lisati colture cellulari e tamponi
Topo TA cloning Kit (Invitrogen)	Clonaggio di prodotti PCR
Pure link Quick plasmid miniprep kit (Invitrogen)	Purificazione DNA plasmidico
Ribomax Large scale RNA Production System- T7 (Promega)	Trascrizione in vitro
NucleoSpin Extract II (Macheray-Nagel)	Purificazione prodotti di amplificazione

TABELLA n. 1

RealTime RT-PCR SybrGreen

Questo protocollo “home-made” consente l’identificazione di ceppi PRRSv sia europei che americani mediante retrotrascrizione e successiva amplificazione di un tratto dell’ORF 7 contenuta nel loro genoma utilizzando primer descritti da Lurchachaiwong et al. (2008). Tale reazione è stata messa a punto per essere condotta in multiplex con una seconda reazione di RT-PCR in grado di amplificare un controllo interno di reazione di RNA, denominato InType-ICRNA e commercialmente disponibile, con la coppia di primer EGFP-1F e EGFP-2R descritta da B. Hoffmann et al. (2006).

Con tale reazione è possibile distinguere i prodotti di amplificazione ottenuti dai ceppi PRRSv europeo ed americano e dal controllo interno, in base alle loro diverse temperature di melting (in seguito denominate T_m):

- Ceppo europeo T_m 85,5±0,5
- Ceppo europeo sperimentazione T_m 85,0±0,5
- Ceppo americano T_m 84,0±0,5

- Controllo interno Tm 88,6±0,5

Le reazioni vengono condotte sullo strumento LightCycler480 (Roche) e i risultati analizzati con il software LightCycler480 SW 1,5 impostando, in fase di Tm calling, la ricerca con un massimo di 6 picchi.

Il programma di amplificazione impiegato è il seguente :

- Step 1: RETROTRASCRIZIONE 50°C /5min
- Step 2: ATTIVAZIONE TAQ 95°C / 2 min
- Step 3: DENATURAZIONE 95°C / 10 sec
- Step 4: ANNEALING ed ESTENSIONE 60°C / 30 sec
- NUMERO DI CICLI da Step 3 a Step 4 40
- CURVA DI DENATURAZIONE Da 64°C a 95°C

I reagenti e le relative concentrazioni impiegati nella miscela di reazione per la retrotrascrizione/PCR sono indicati nella **tabella n. 2**.

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 reazione
2X Reaction Mix	1X	5,0 µl
Primer PRRSV F 10 µM	0,40 µM	0,4 µl
Primer PRRSV R 10 µM	0,40 µM	0,4µl
Primer EGFP-1F 10 µM	0,10 µM	0,1µl
Primer EGFP-2R 10 µM	0,10 µM	0,1µl
SuperScript. III RT/Platinum <i>Taq</i> Mix		0,2µl
InType- ICRNA 2000copie/l	10 copie/l	0,5µl
Acqua bidistillata sterile DNase- RNase free		2,3µl
VOLUME TOTALE		
Vortexare la mix preparata per pochi secondi e centrifugare brevemente. Distribuire la mix in aliquote da 9µl in ciascun pozzetto della piastra con fondo bianco dedicata allo strumento		9 µl
VOLUME CAMPIONE RNA		
Aggiungere l' RNA nelle rispettive provette e centrifugare brevemente		1 µl
VOLUME FINALE DI REAZIONE		10 µl

TABELLA n. 2

L'acquisizione dei dati di fluorescenza viene eseguita al termine di ogni step di annealing-estensione durante la PCR ed in continuo nella esecuzione della curva di denaturazione.

Il campione viene considerato positivo per PRRSV se c'è almeno un picco con T_m che cada negli intervalli di T_m indicati per i ceppi europei ed americani, negativo se c'è il picco corrispondente alla T_m del controllo interno, inibito se non è possibile identificare alcun picco corrispondente ai ceppi PRRSV (europei ed americani) ed al controllo interno. In caso di campione inibito l'analisi dovrebbe essere ripetuta.

RealTime RT-PCR con sonda (HighConfidence / HighSensitivity)

Questo protocollo “home-made” consente l’identificazione di ceppi PRRSV sia europei che americani mediante retrotrascrizione e successiva amplificazione di un tratto dell’ ORF 7 contenuto nel loro genoma. I primers e le sonde (marcate in 5’ con FAM ed Hex rispettivamente) utilizzati, sono quelli descritti da Lurchachaiwong et al. (2008). Appositamente per questo studio è stata disegnata un’ulteriore sonda poiché in seguito a falsi negativi nelle prove di validazione e successivo sequenziamento del genoma virale è risultato chiaro come il ceppo utilizzato nell’infezione sperimentale fosse consistentemente lontano filogeneticamente dagli stipiti storicamente circolanti in azienda. (vedi dendrogramma n.xx, pag. YY). Questa sonda è stata denominata Sonda europea 2 e così disegnata: 5’-FAM-ATGATGAAA-ZEN-TCCCAGCGCCAGCGGT-3’-IAbkFQ.

Tale reazione è stata messa a punto per essere condotta in multiplex con una ulteriore reazione di RT-PCR in grado di amplificare un controllo interno di reazione di RNA, denominato InType-ICRNA e commercialmente disponibile, con la coppia di primer EGFP-1F e EGFP-2R e con la sonda, marcata in 5’ con Cy5, descritta da B. Hoffmann et al. (2006).

Le reazioni sono state condotte sullo strumento LightCycler480 (Roche) e i risultati analizzati con il software LightCycler480 SW 1,5 impostando, in fase di quantificazione mediante derivata seconda, l’opzione HighConfidence. Nelle prove condotte sui campioni raccolti in sede d’infezione sperimentale, ai fini di una valutazione comparativa, l’esito della reazione è stato calcolato ricorrendo anche all’opzione HighSensitivity, algoritmo di elaborazione sviluppato dal fornitore al fine di massimizzare la sensibilità del test.

In ogni piastra si inserisce un bianco e l’opportuno standard da utilizzare per l’eventuale analisi quantitativa assoluta.

Il programma di amplificazione impiegato è il seguente:

- Step 1: RETROTRASCRIZIONE 50°C /15min
- Step 2: ATTIVAZIONE TAQ 95°C / 2 min
- Step 3: DENATURAZIONE 95°C / 10 sec
- Step 4: ANNEALING ed ESTENSIONE 60°C / 30 sec
- NUMERO DI CICLI da Step 3 a Step 4 40

I reagenti e le relative concentrazioni impiegati nella miscela di reazione per la retro trascrizione/PCR sono indicati nella **tabella n. 3**.

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 reazione
2X Reaction Mix	1X	5,0 µl
Primer PRRSV F 10 µM	0,30 µM	0,3 µl
Primer PRRSV R 10 µM	0,30 µM	0,3µl
Primer EGFP-1F 10 µM	0,40 µM	0,4µl
Primer EGFP-2R 10 µM	0,40 µM	0,4µl
Sonda Europea FAM/ZEN/IABkFQ 20 µM	0,20 µM	0,1µl
Sonda Europea 2 FAM/ZEN/IABkFQ 20 µM	0,20 µM	0,1µl
Sonda Americana HEX/IABkFQ 20 µM	0,20 µM	0,1µl
Sonda Controllo interno Cy5/IABkRQ 20 µM	0,40 µM	0,2µl
SuperScript. III RT/Platinum <i>Taq</i> Mix		0,2µl
InType- IC-RNA 2000copie/l	20 copie/l	1,0µl
Acqua bidistillata sterile DNase- RNase free		0,9µl
VOLUME TOTALE		
Vortexare la mix preparata per pochi secondi e centrifugare brevemente. Distribuire la mix in aliquote da 9µl in ciascun pozzetto della piastra con fondo bianco dedicata allo strumento		9 µl
VOLUME CAMPIONE RNA		
Aggiungere l' RNA nelle rispettive provette e centrifugare brevemente		1 µl
VOLUME FINALE DI REAZIONE		10 µl

TABELLA n. 3

L'acquisizione dei dati di fluorescenza viene eseguita al termine di ogni step di annealing-estensione della PCR. Il campione viene considerato: positivo per PRRSV ceppo europeo se si ottiene, con il metodo di quantificazione della derivata seconda, un Cp leggendo la fluorescenza nell'intervallo di λ corrispondente al fluoroforo FAM; positivo per PRRSV ceppo americano se si ottiene, con il metodo di quantificazione della derivata seconda, un Cp leggendo la fluorescenza nell'intervallo di λ corrispondente al fluoroforo Hex; negativo se si ottiene, con il metodo di quantificazione della derivata seconda, un Cp leggendo la fluorescenza nell'intervallo di λ corrispondente al fluoroforo Cy5 e nessun Cp per le letture in FAM ed Hex; inibito se non si ottiene alcun risultato. Nel caso di campione che risulti inibito l'analisi dovrebbe essere ripetuta.

I valori di Cp ottenuti sono riconducibili a un valore di titolo virale con la costruzione di una curva standard. Le curve utilizzate come standard sono quelle ottenute nelle prove di sensibilità analitica per le varie matrici saggiate. Ciascun punto delle curve è frutto dei dati ottenuti da estrazioni separate di tre aliquote del campione. Si riporta nel **grafico n. 1** l'esempio di curva standard per il siero, per ciascun punto della quale si fornisce un valore di titolo virale calcolato a priori sapendo il valore del titolo virale nel campione di partenza. La curva ottenuta non ha ovviamente efficienza pari a quella che si otterrebbe da diluizioni seriali a partire da un'unica estrazione di RNA poiché risente anche delle diverse efficienze di estrazione a seconda della quantità di virus nei campioni. Questa curva è stata comunque scelta per la quantificazione del titolo virale dei campioni di siero diagnostici.

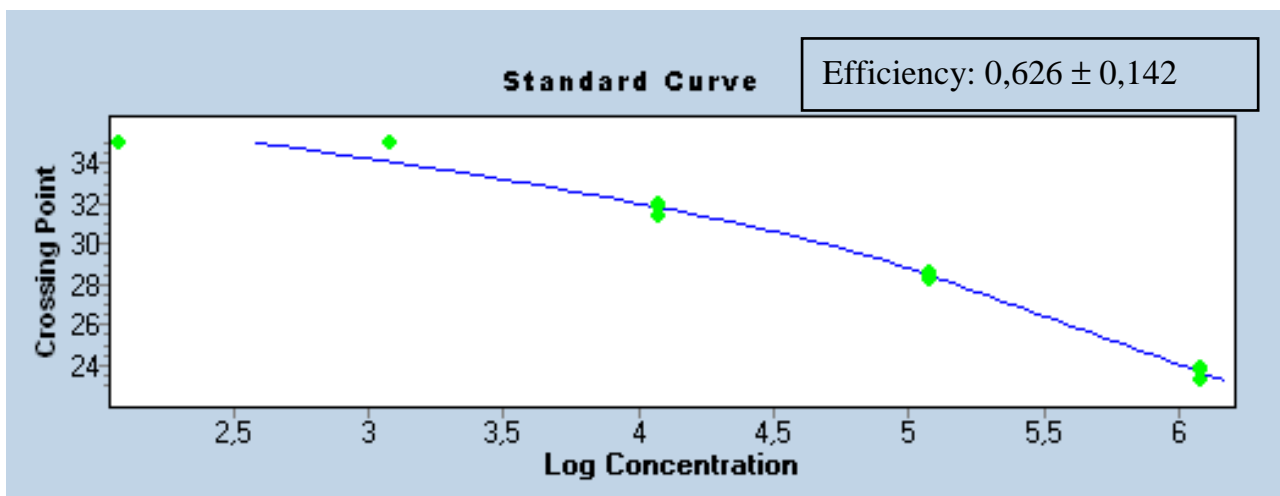


GRAFICO n. 1

9.3 Validazione

La validazione di un metodo è quel processo atto a dimostrare tramite esperimenti che la procedura di prova è adatta allo scopo prefissato. Per i metodi considerati sono stati definiti i parametri di sensibilità analitica e specificità analitica, nonché la ripetibilità within run and between days. Inoltre prendendo in considerazione i singoli metodi biomolecolari e confrontandoli tra loro è possibile anche definirne le relative sensibilità e specificità diagnostica sulla base degli esiti ottenuti per i campioni a reattività nota raccolti in fase di infezione sperimentale. La procedura è riconducibile a quanto stabilito nel capitolo 1.1.5 del Manuale OIE (2008) “ Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases.” OIE Terrestrial Manual 2008.

Tra le matrici biologiche disponibili sono state prescelte per la validazione quelle solitamente inviate ai laboratori diagnostici e precisamente:

- Siero di sangue suino
- Organi elettivi (polmone)
- Lisato cellulare infetto con inoculo sospetto

Si specifica che la determinazione della sensibilità analitica in matrice “lisato cellulare” è importante in quanto le analisi biomolecolari possono essere richieste a conferma di un isolamento virologico su substrati cellulari, quindi è opportuno definirne il limite di rilevazione.

L’infezione sperimentale inoltre ha permesso di sottoporre ad analisi biomolecolari anche matrici meno frequentemente conferite al laboratorio, quali tamponi nasali, auricolari e salivari per una determinazione della valenza diagnostica di questi materiali biologici.

I campioni delle 3 matrici prescelte sono stati preparati all’estrazione in base alla loro tipologia come qui descritto:

- siero: il sangue viene lasciato coagulare a temperatura ambiente, in seguito preparato in aliquote di circa 1 ml di siero destinate alle analisi biomolecolari e stoccato in congelatore a – 80°C previa registrazione ed identificazione mediante etichettatura delle provette in maniera univoca. In provetta sterile tipo eppendorf, vengono pipettati mediante un puntale sterile con filtro 200 µl di siero/plasma e miscelati con 400 µl di Lysis/Binding Buffer (addizionato con polyA) fornito dal kit “High Pure Viral RNA Kit”;

- polmone: utilizzando forbici e pinze sterili vengono prelevati e deposti in un sacchetto per stomacher circa 2-3 grammi del tessuto; viene aggiunto PBS in base al peso del campione in modo da ottenere una diluizione di 1:10. Viene riposto il sacchetto nello stomacher e omogeneizzato a velocità media per due minuti; vengono trasferiti al massimo 9 ml di omogenato in una provetta da 10 ml. In provetta sterile tipo eppendorf, mediante un puntale sterile con filtro vengono pipettati 200 µl di surnatante e miscelati con 400 µl di Lysis/ Binding Buffer (addizionato con 300 µl di etanolo) fornito dal kit “High Pure RNA Tissue Kit”;
- lisato cellulare: la coltura cellulare infetta viene congelata, scongelata e raccolta in provetta; viene centrifugata a 1800 g per 5 minuti. In provetta sterile tipo eppendorf, mediante puntale sterile con filtro vengono pipettati 200 µl di surnatante e miscelati con 400 µl di Lysis/ Binding Buffer fornito dal kit “High Pure RNA Isolation Kit”.

In fase di estrazione viene aggiunto alle matrici un controllo interno universale denominato InType IC-RNA (LDL) in un volume di 5 µl pari a circa 10^4 molecole/µl, che coestratto e coamplificato con primers e sonda specifici funge da sentinella dell’efficienza di reazione, monitorando la presenza di eventuali inibitori nella matrice in esame.

Sensibilità analitica

Al fine di determinare il limite di rilevazione analitica dei metodi considerati (LoD – limit of detection), sono state allestite delle diluizioni seriali in base 10 (dal tal quale fino ad una diluizione pari a 10^{-8}) delle matrici biologiche in esame a titolo noto (colture cellulari lisate infette con ceppo europeo e americano di PRRSv , siero suino, polmone).

Le diluizioni vengono fatte usando come diluente il liquido di coltura utilizzato per coltivare il microrganismo: nel caso di cellule infettate con ceppi di riferimento sono state impiegate cellule MARC 145 non infette, siero negativo proveniente da allevamento indenne per le diluizioni seriali del siero positivo ed omogenato d’organo di suino negativo per il polmone. Aliquote pari a 200µl di ciascuna diluizione sono state estratte, eluite in 50µl (o 100µl nel caso dell’organo) ed analizzate. I diluenti o altri campioni preventivamente analizzati e risultati negativi hanno costituito i controlli negativi di reazione (se aggiunti direttamente durante l’allestimento della reazione) e di processo (qualora siano parte integrante di tutte le

fasi del processo compresa l'estrazione degli acidi nucleici) al fine di determinare la possibile interferenza delle matrici con la rilevazione del virus target.

Per quanto concerne la matrice "tampona", non avendo a disposizione tamponi sicuramente positivi a priori da diluire in tamponi negativi, considerando anche i volumi notevoli da prelevare per effettuare tutte le prove di validazione, è stato deciso di valutare la sensibilità analitica mediante spike di 25µl (pari a circa 10^7 molecole/ µl) di ciascun retroscritto dei plasmidi costruiti, diluito in base 10 in tampone proveniente da un allevamento indenne, pertanto sicuramente negativo. Le diluizioni così allestite sono state poi estratte e sottoposte ai protocolli.

Sono stati saggiati 2 ceppi europeo di PRRSv (uno di riferimento e uno di campo) e 1 ceppo americano, in quanto il secondo ceppo americano era di difficile reperimento (es. per linea genetica, tipo antigenico, provenienza geografica). Tuttavia abbiamo tenuto conto che sul nostro territorio i ceppi circolanti sono principalmente ascrivibili a ceppi europei, quindi epidemiologicamente più significativi al momento della valutazione delle performance dei test. Per ogni diluizione, l'analisi in RT-PCR è stata eseguita almeno in triplicato.

Specificità analitica

Con questa prova si è inteso dimostrare che i microrganismi non target (es. microrganismi tassonomicamente correlati, altri patogeni e commensali che ragionevolmente potrebbero essere presenti nel campione in esame) non danno reazioni di falsa positività utilizzando i protocolli in esame. Per questa ragione, l'analisi è stata eseguita utilizzando microrganismi non target ad elevate concentrazioni. In questo caso la prova è stata effettuata impiegando i microrganismi target e non target qui di seguito elencati:

- Prrs ceppo virale europeo di riferimento fornito da IZS-LER
- Prrs ceppo virale americano di riferimento fornito da IZS-LER
- Prrs ceppo virale europeo di campo sequenziato
- Prrs ceppo virale europeo di campo sequenziato
- Prrs ceppo virale europeo di campo sequenziato
- Prrs ceppo virale europeo di campo sequenziato
- Altri virus ad RNA
 - Influenza suina H1N1
 - Influenza suina H1N2

- BVD NADL
- Altri virus a DNA
 - Herpesvirus suino tipo 1
 - Circovirus suino tipo 2
 - Parvovirus suino
- Batteri e altri microrganismi procarioti
 - Escherichia coli emolitico
 - Streptococcus suis
 - Chlamydia suis

Ripetibilità analitica

Attraverso le prove di ripetibilità intra-laboratorio si intende dimostrare la precisione del metodo all'interno dello stesso laboratorio eseguendo prove ripetute nell'ambito della stessa seduta di lavoro (*within-run variance*) e in giorni differenti (anche da operatori diversi, *between-day variance*).

Per stimare la precisione del metodo sono state condotte con campioni in triplicato di lisato cellulare infetto da PRRSV ceppo europeo e americano (in tal quale, intermedia e bassa, cioè non oltre 2x-3x LoD, concentrazione) le prove di RT-PCR ripetute in giorni differenti da 2 operatori diversi. Nel caso in cui le diluizioni ottenute in fase di definizione della sensibilità analitica siano tra di loro consecutive è stato deciso di eseguire la ripetibilità solo sulle diluizione alta e la bassa, tralasciando l'intermedia. Un campione aggiuntivo costituito da acido nucleico di microrganismi non target viene processato in ogni prova.

Nelle diluizioni di omogenato d'organo positivo per ceppo europeo in omogenato negativo pur avendo stabilito 3 diverse concentrazioni, dopo la prima prova sono state modificate le diluizioni prescelte per la ripetibilità ed analizzate soltanto la alta e la bassa (tal quale e 10^{-2}) in quanto altrimenti risultavano essere consecutive.

Soltanto il polmone, matrice complessa, è stato riestratto in tutti i 3 giorni delle prove di ripetibilità, mentre per siero e cellule infette con i diversi ceppi, l'estrazione delle concentrazioni prescelte è stata effettuata il primo giorno, poi l'RNA estratto è stato aliquotato e conservato a -80°C , fino alla prova successiva.

Nel caso di valutazione del processo analitico *in toto* (inclusa l'estrazione dell'acido nucleico) non abbiamo ritenuto necessario effettuare ad ogni prova una nuova estrazione,

dal momento che le matrici stabilite per la ricerca del virus della PRRS non sono da considerarsi complesse. Abbiamo effettuato comunque una seconda estrazione all'inizio delle prove di ripetibilità da quelle 2 o 3 diluizioni prescelte da saggiare, aliquotando e conservando a -80°C l'RNA estratto nella prima seduta. Ogni aliquota (sia essa acido nucleico o matrice più complessa) è stata testata in tre repliche e in tre giorni differenti da 2 operatori distinti.

10. RISULTATI

10.1 Analisi dei risultati di validazione delle metodiche RealTime RT-PCR SybrGreen e RealTime RT-PCR con sonda (HighConfidence / HighSensitivity)

Sensibilità analitica

Le LoD (limit of detection) ottenute per le varie matrici con i diversi protocolli sono riassunte nella seguente **tabella n. 4**.

		RT-PCR RealTime SybrGreen	RT-PCR Realtime HighConfidence
matrice biologica	Marc 145 infette ceppo Eu	10^{-5} (pari a $10^{1,2}$ copie/ μ l)	10^{-5} (pari a $10^{1,2}$ copie/ μ l)
	Marc 145 infette ceppo AM	10^{-5}	10^{-5}
	Siero	10^{-4} (pari a $10^{2,1}$ copie/ μ l)	10^{-4} (pari a $10^{2,1}$ copie/ μ l)
	polmone	10^{-2}	10^{-2}

TABELLA n. 4

Risultati di falsa negatività sono stati registrati per il protocollo in RealTime con sonda disegnata in casa. Poiché ciò non è stato riscontrato nel protocollo Realtime con SybrGreen per il quale si utilizzano i medesimi primer, il problema è stato sicuramente da attribuirsi ad un mancato appaiamento della sonda. Per verificare quest' ipotesi si è provveduto ad amplificare e sequenziare, con i primer descritti da Oleksiewicz et al. 1998, l'ORF 7 del ceppo PRRSv utilizzato per l'infezione sperimentale. La sequenza ottenuta ha evidenziato come questo stipite virale appartenga ad un cluster diverso rispetto sia ai ceppi di

riferimento sia ai ceppi storicamente circolanti nell'azienda impiegata per l'infezione sperimentale (vedere dendrogramma nella **figura n. 3**).

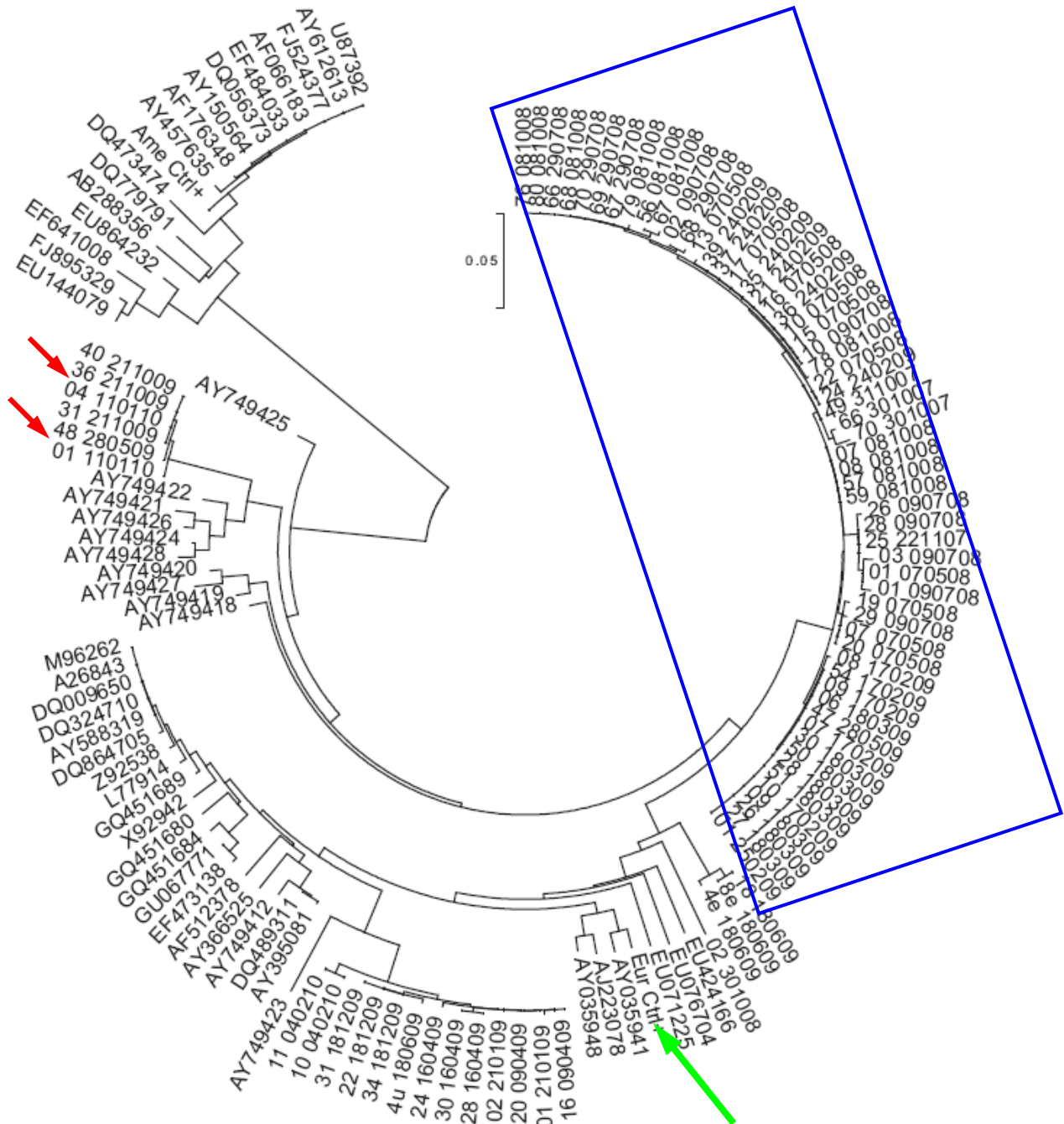


FIGURA n. 3: dendrogramma in cui sono evidenziati i ceppi storici circolanti in azienda (in blu), il ceppo inoculato nell'infezione sperimentale (in rosso) e il controllo positivo (in verde).

In particolare nella porzione di sequenza corrispondente alla sonda descritta da Oleksiewicz et al. (1998) sono stati riscontrati 5 mismatches localizzati principalmente in 5'. Per ovviare

all'inconveniente si è provveduto a disegnare una sonda che riconosca il ceppo utilizzato per l'infezione sperimentale e ad adattare il protocollo utilizzando per il riconoscimento dei ceppi europei le due sonde contemporaneamente. Il nuovo protocollo si è rivelato efficace nel riconoscere il virus a partire dai campioni prelevati dagli animali infettati sperimentalmente.

Specificità analitica

Per la prova di inclusione sono stati saggiati lisati di cellule Marc145 infettate con 4 ceppi di campo diversi geneticamente, raccolti e caratterizzati in precedenti studi di epidemiologia molecolare. Per la prova di esclusione sono stati analizzati acidi nucleici estratti da altri virus e batteri di collezione, alcuni dei quali potenziali agenti patogeni del suino, come ceppi di virus influenzale suino (H1N1 e H1N2), virus PHV-1, parvovirus suino, oltre a RNA di BVD e ceppi batterici come *Streptococcus suis* e *Chlamydia suis*. Un'aliquota di brodocoltura di *E.coli* beta-emolitico è stata inclusa nella prova in quanto è stata segnalata la possibilità, seppur rara, di bande aspecifiche, simili al peso molecolare della banda determinata dal ceppo americano, ascrivibili a ceppi di *E.coli* e facilmente individuabili grazie ad una seconda coppia di primers specifici. Se in fase di PCR multiplex si osserva tale banda, si procede ad amplificare il campione con PRRS – Senso Ame 2 e PRRS – Rev (AME) nelle medesime condizioni di PCR. In caso di vera positività per lo stipite americano, si osserva un amplificato di circa 200-230bp.

L'esito della prova di inclusione è riportato in **tabella n. 5**.

Ceppo PRRS europeo di campo →	1	2	3	4
Realtime PCR SyBrGreen	neg	inibito	pos	neg
Realtime PCR HighConfidence	pos	pos	pos	neg

Tabella n. 5

Nel valutare i risultati bisogna tener conto che si tratta di campioni di RNA estratti alcuni mesi fa e sottoposti a diversi cicli di congelamento-scongelo, fatto che potrebbe averne pregiudicato l'integrità.

L'esito della prova di esclusione è stata di completa negatività dei campioni non target esaminati per entrambe le metodiche.

Ripetibilità analitica

Nonostante il congelamento-scongelo delle aliquote di acido nucleico, non è stato influenzato l'esito positivo della ripetibilità, che è risultata perfetta per ambe le metodiche su tutte le matrici e le corrispondenti diluizioni che vengono indicate in **tabella n. 6**.

		RT-PCR Realtime SybrGreen	RT-PCR Realtime HighConfidence
matrice biologica	Marc 145 infette ceppo Eu	10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5}	10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5}
	Marc 145 infette ceppo AM	Tq, 10^{-2} , 10^{-4}	Tq, 10^{-2} , 10^{-4}
	Siero	Tq, 10^{-2} , 10^{-4}	Tq, 10^{-2} , 10^{-4}
	Polmone	Tq e 10^{-2}	Tq e 10^{-2}

TABELLA n. 6

10.2 Risultati delle analisi sui campioni sperimentali

Durante l'infezione sperimentale sono stati complessivamente prelevati (matrici: siero, tamponi nasale, orale ed auricolare):

- 528 campioni sui 12 animali infettati sperimentalmente
- 20 campioni sui 5 capi di controllo negativo

In **tabella n. 7** sono riportati gli esiti del gruppo di controllo negativo.

MATRICE	Data prelievo	esito PCR classica	esito PCR Sybr	esito PCR Real Time
siero	22/01/2010	pos/neg	neg	neg
siero	22/01/2010	pos/neg	neg	neg
siero	22/01/2010	pos/neg	neg	neg
siero	22/01/2010	pos/neg	neg	neg
siero	22/01/2010	pos/neg	neg	neg
tampone nasale	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone nasale	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone nasale	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone nasale	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone nasale	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone orale	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone orale	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone orale	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone orale	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone orale	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone vena auric	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone vena auric	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone vena auric	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone vena auric	22/01/2010	neg	neg	neg
tampone vena auric	22/01/2010	neg	ini	neg

TABELLA n. 7: i risultati per il siero, risultati positivi la prima volta, sono stati ripetuti e risultati negativi.

Per quanto riguarda la RT-PCR classica le positività sono state attribuite a seconda dell'intensità della banda.

Per quanto riguarda i risultati della RealTime RT-PCR con Sybr Green sono state valutate le Tm dei picchi ottenuti in grafico.

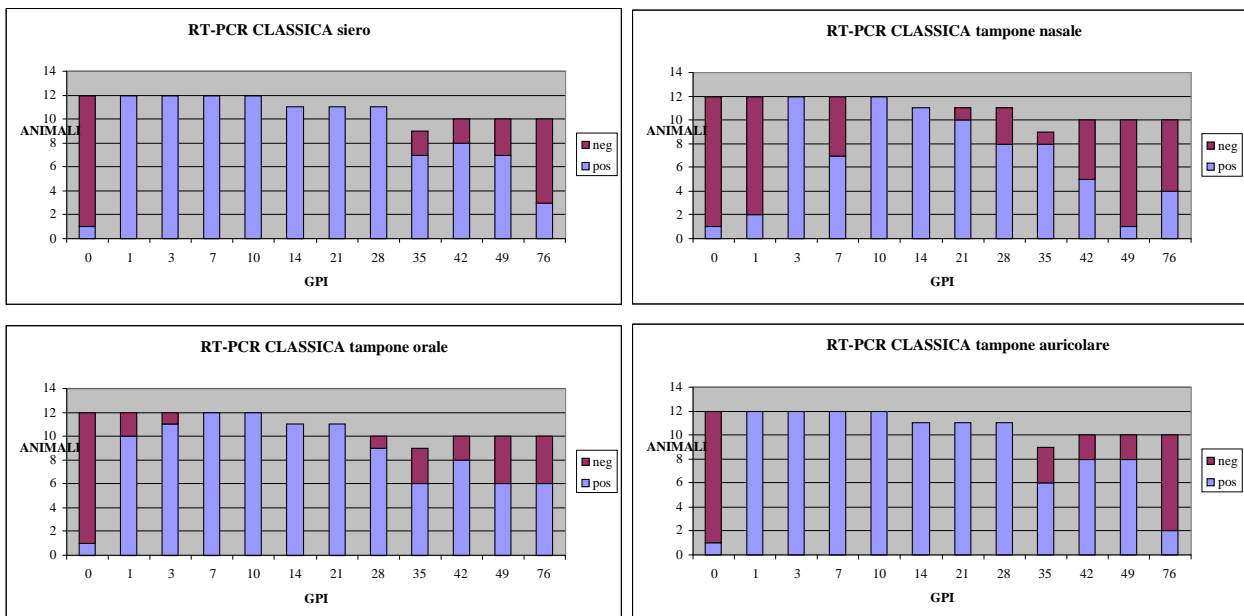
Per quanto riguarda i risultati della RealTime RT-PCR con sonda "home-made" le positività quantificate in Cp, successivamente sono state tradotte in un titolo virale costruendo una curva standard . Viene riportata in **tabella n. 8** l'equivalenza dei valori di titolo virale (t.v.) vs Cp.

Pos	$C_p \geq 35,00$	$t.v. \geq 1,20 \cdot 10^3$
pos+	$30,00 < C_p < 35$	$1,51 \cdot 10^5 < t.v. < 1,20 \cdot 10^3$
pos++	$25,00 < C_p < 30$	$1,23 \cdot 10^6 < t.v. < 1,51 \cdot 10^5$
pos+++	$C_p \leq 25,00$	$t.v. \leq 1,23 \cdot 10^6$

TABELLA n. 8

RT-PCR Classica two steps

La RT-PCR classica sebbene nelle prove di validazione abbia avuto ottimi valori di sensibilità e di specificità (dati riportati in appendix 1), nei risultati dei campioni sperimentali mostra alcuni problemi di specificità. Lo denotano i falsi positivi ottenuti nei campioni di siero degli animali di controllo negativo (risultati negativi dopo ripetizione) e le positività presenti al giorno zero di infezione ovvero prima dell'inoculo degli animali (vedi **grafico n. 2.1-2.2-2.3-2.4**).



GRAFICI n. 2.1-2.2-2.3-2.4: istogrammi relativi alle differenti matrici (siero, tampone nasale, orale e auricolare) che rappresentano l'andamento delle positività e negatività con la RT-PCR CLASSICA durante l'infezione.

Il fattore soggettività nella lettura del risultato è un punto a sfavore di questa metodica. Nella valutazione delle bande in gel di agarosio o di acrilamide (usato per una maggiore definizione delle bande), nella valutazione del loro avanzamento rispetto alla banda di controllo (di peso molecolare conosciuto) e nella classificazione della loro intensità che influisce sull'esito di positività o negatività del campione.

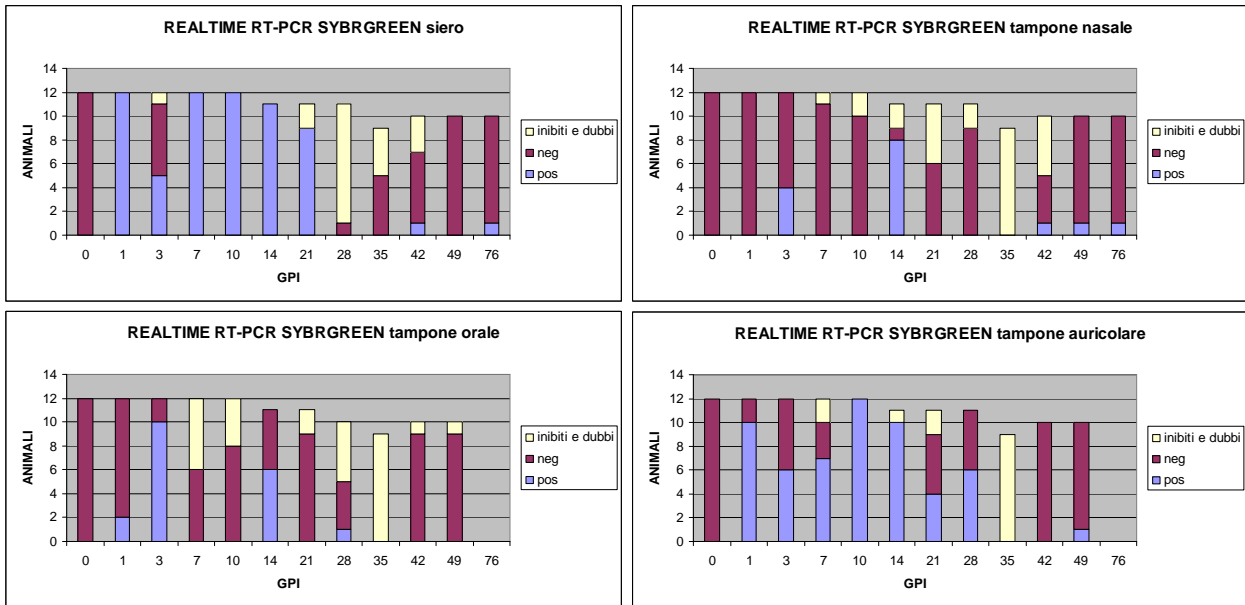
RealTime RT-PCR SybrGreen

La metodica SybrGreen è detta semiquantitativa in quanto in base al picco si può dedurre la quantità di virus (RNA) nel campione (con il valore del CT). C'è da dire che la significatività della quantificazione dipende dalla quantità di virus presente nel campione, ovvero:

- con alte quantità di virus, si ha un livello alto di target e quindi le sonde andranno a legarsi all'RNA del virus specifico. Graficamente si ottiene un macropicco dell'amplificato specifico e il valore del CT ottenuto è relativo appunto all'amplificato di interesse.
- con basse quantità di virus, le sonde andranno a legarsi al target di interesse tanto quanto a target di amplificato aspecifico. Graficamente si ottengono quindi differenti picchi e ne consegue che il valore di CT ottenuto non è più relativo all'amplificato specifico, ma alla somma dei diversi picchi di fluorescenza dei diversi amplificati (specifici e aspecifici) e pertanto non è più un valore volto a quantificare il target iniziale.

Il problema di questa metodica è dovuto alla variabilità dei picchi, che bisogna discriminare tra specifici e aspecifici, andandone a verificare la Tmelting (temperatura di melting) e interpretare se essa sia uguale a quella conosciuta relativa al target specifico. Nel corso delle analisi si è dato il risultato di "dubbio" quando il picco non era chiaramente né specifico né aspecifico. Nel caso di questo studio, il SybrGreen si dimostra un buon metodo quantitativo nel periodo di massima viremia (giorni 7-21 post infezione).

Nella RealTime RT-PCR con SybrGreen l'introduzione del controllo interno ha permesso di evidenziare molti campioni che risultano inibiti anche dopo la ripetizione dell'analisi e che, in assenza del controllo interno, sarebbero stati classificati come negativi. Proprio a causa di questo consistente numero di inibiti (osservabile nei **grafici n. 3.1-3.2-3.3-3.4** che seguono) non è stato possibile includere questa metodica nella comparazione diagnostica, che riguarderà pertanto solo la RT-PCR classica e la RealTime RT-PCR con sonda home-made.

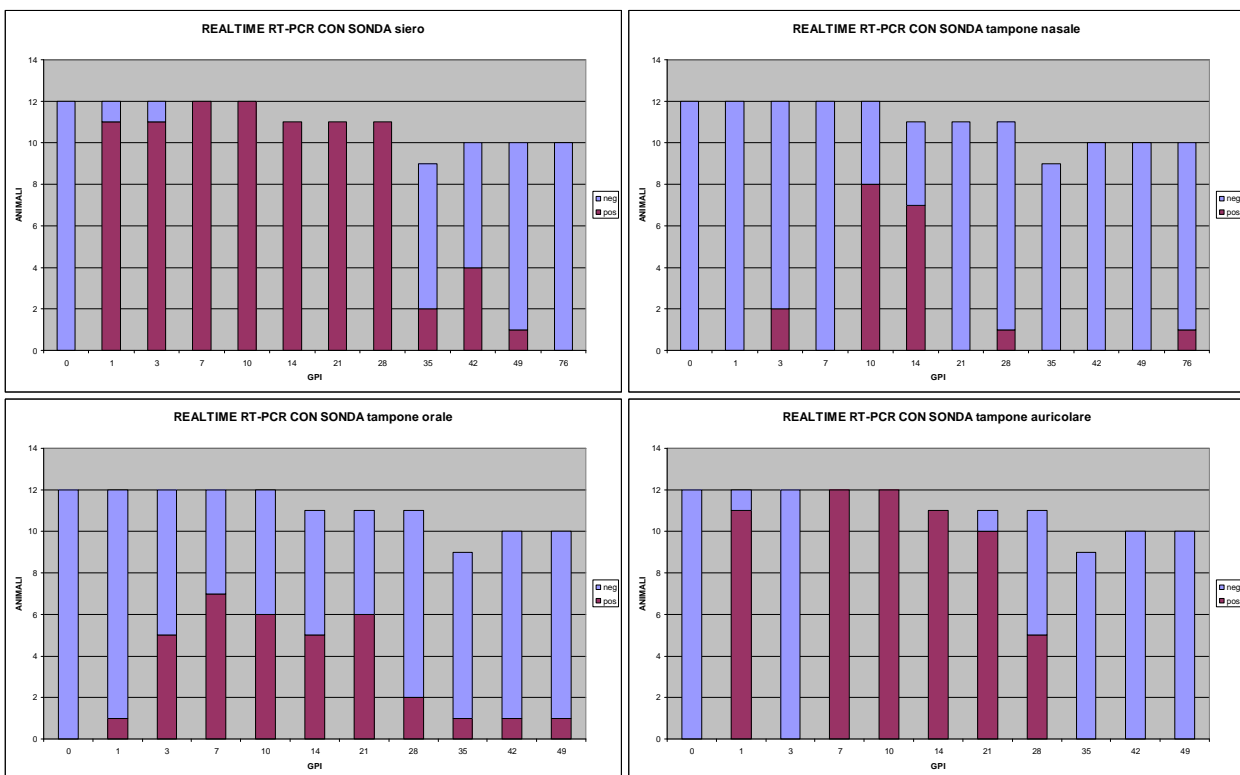


GRAFICI n. 3.1-3.2-3.3-3.4: istogrammi relativi alle differenti matrici (siero, tampone nasale, orale e auricolare) che rappresentano l'andamento delle positività e negatività con la RealTime RT-PCR Syb rGreen durante l'infezione (i risultati inibiti e dubbi sono stati considerati come un unico gruppo).

RealTime RT-PCR con sonda (HighConfidence e HighSensitivity)

Per quanto riguarda la prova RealTime RT-PCR con sonda home-made, l'applicazione dei due algoritmi di calcolo (HighConfidence e HighSensitivity) evidenzia un certo recupero di sensibilità ottenuto col protocollo HighSensitivity, senza peraltro andare a perdere in specificità. Per l'analisi dei dati sono stati tenuti in considerazione i risultati della HighConfidence perché è l'algoritmo dato di default dal software.

Nei **grafici n. 4.1-4.2-4.3-4.4** è illustrato l'andamento delle positività e negatività durante l'infezione.



GRAFICI n. 4.1-4.2-4.3-4.4: istogrammi relativi alle differenti matrici (siero, tampone nasale, orale e auricolare) che rappresentano l'andamento delle positività e negatività con la RealTime RT-PCR con sonda HC durante l'infezione.

Il problema iniziale dovuto non tanto alla mancanza di sensibilità analitica con i ceppi di riferimento standard, bensì al mancato riconoscimento del ceppo impiegato per l'infezione sperimentale, è stato risolto con il disegno di una nuova sonda apposita. Quanto successo porta all'importante considerazione che l'adozione di kit commerciali già ottimizzati e validati dalle ditte fornitrici deve comunque prevedere una fase di riesame preliminare alla messa in routine nel laboratorio, con particolare attenzione agli stipiti circolanti sul territorio

di competenza, per prevenire casi di falsa negatività, conseguenti ad una ridotta sensibilità diagnostica. L'adozione di metodi con sonde home-made quindi può risultare talvolta conveniente e più efficace in quanto mostra una maggiore flessibilità ed adattamento alle esigenze del territorio, differentemente da quanto si può fare utilizzando dei kit commerciali.

Altro vantaggio dell'utilizzo della RealTime RT-PCR con sonda è la possibilità di quantificare i valori ottenuti di Cp in titolo virale con la costruzione di una curva standard.

Il **grafico n. 5** riporta i risultati in titolo virale ricavati dalla curva e relativi alla matrice siero, con il classico andamento della viremia in corso di infezione. Utilizzando i valori di Cp questo andamento risulterebbe molto schiacciato data la relazione logaritmica tra Cp e titolo virale.

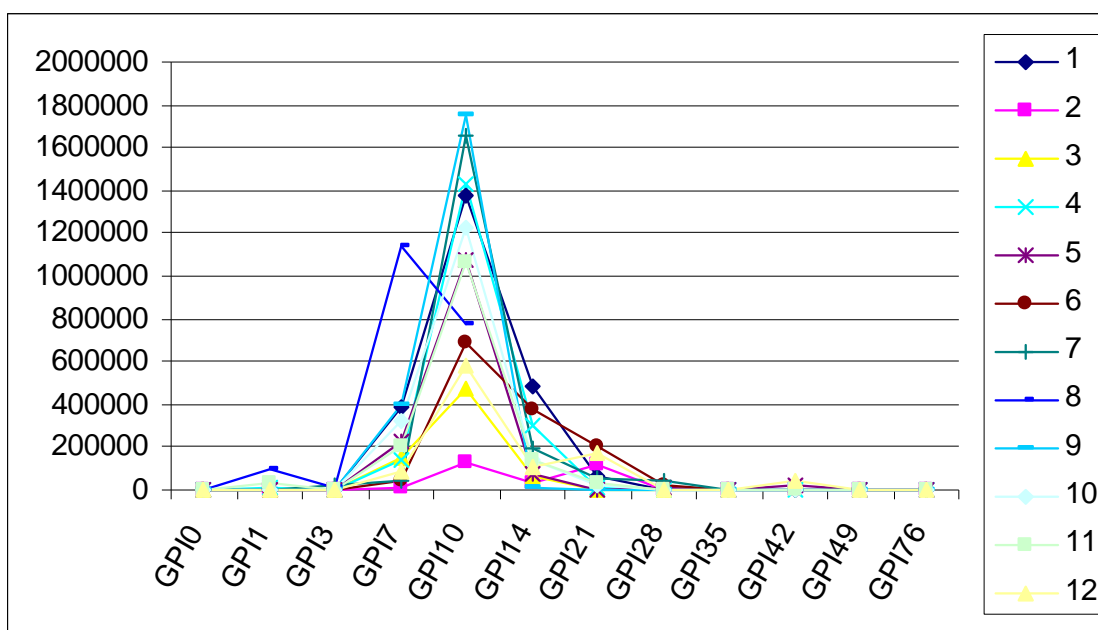


GRAFICO n. 5

10.3 Comparazione tra i metodi diagnostici (RT-PCR classica e RealTime RT-PCR con sonda)

Come già anticipato precedentemente, il confronto tra metodiche è stato eseguito tra RT-PCR classica e RealTime RT-PCR con sonda, escludendo la RealTime RT-PCR in SybrGreen per le numerose inibizioni (dovute forse anche alla mancanza della possibilità di eseguire un'ulteriore ripetizione).

Le due metodiche sono entrambe molto valide, anche se manifestano differenze sostanziali. Il confronto è stato eseguito su tutte e 4 le matrici. Le metodiche sono state alternativamente considerate come gold standard e confrontate sia sui risultati complessivi dell'infezione, sia suddividendo l'infezione in tre periodi di seguito descritti:

- periodo GPI 0-3: contiene il campionamento dei giorni post infezione 0-1-3
- periodo GPI 7-21: contiene il campionamento dei giorni post infezione 7-10-14-21
- periodo GPI 28-49: contiene il campionamento dei giorni post infezione 28-35-42-49

Sono stati calcolati sensibilità, specificità e valori di concordanza K di Cohen con il software SPSS for Windows, Rl. 12.0.1. 2001, Chicago:SPSS inc.

La misura della concordanza tra i metodi è stata interpretata secondo la scala seguente:

- $\leq 0,20$ poor
- 0,21 – 0,40 fair
- 0,41 – 0,60 moderate
- 0,61 – 0,80 good
- 0,81 – 1,00 very good

		GOLD STANDARD								
		PCR			REALTIME HC			REALTIME HS		
		K =	Se =	Sp =	K =	Se =	Sp =	K =	Se =	Sp =
TUTTI I CAMPIONI	PCR				0,61±0,07	1	0,55	0,66±0,07	1	0,59
	REALTIME HC	0,61±0,07	0,8	1				0,95±0,03	0,96	1
	REALTIME HS	0,66±0,07	0,83	1	0,95±0,03	1	0,93			
GPI 0-3	PCR				0,87±0,08	1	0,85	0,87±0,08	1	0,85
	REALTIME HC	0,87±0,08	0,92	1				1±0	1	1
	REALTIME HS	0,87±0,08	0,92	1	1±0	1	1			
GPI 7-21	PCR					1			1	
	REALTIME HC		1						1	
	REALTIME HS		1			1				
GPI 28-49	PCR				0,3±0,1	1	0,32	0,38±0,12	1	0,37
	REALTIME HC	0,3±0,1	0,54	1				0,85±0,08	0,86	1
	REALTIME HS	0,38±0,12	0,64	1	0,85±0,08	1	0,86			

Tabella n. 9 Matrice siero: confronto tra metodiche diagnostiche nel complesso dell'infezione e nei tre periodi di infezione.

		GOLD STANDARD								
		PCR			REALTIME HC			REALTIME HS		
		K =	Se =	Sp =	K =	Se =	Sp =	K =	Se =	Sp =
TUTTI I CAMPIONI	PCR				0,22±0,05	1	0,27	0,27±0,05	0,96	0,49
	REALTIME HC	0,22±0,05	0,27	1				0,82±0,06	0,75	1
	REALTIME HS	0,27±0,05	0,34	0,98	0,82±0,06	1	0,94			
GPI 0-3	PCR				0,32±0,13	1	0,68	0,32±0,13	1	0,68
	REALTIME HC	0,32±0,13	0,29	1				1	1	1
	REALTIME HS	0,32±0,13	0,29	1	1	1	1			
GPI 7-21	PCR				0,13±0,06	1	0,19	0,21±0,08	1	0,23
	REALTIME HC	0,13±0,06	0,37	1				0,77±0,09	0,75	1
	REALTIME HS	0,21±0,08	0,5	1	0,77±0,09	1	0,84			
GPI 28-49	PCR				0,04±0,04	1	0,47	0,04±0,08	0,7	0,47
	REALTIME HC	0,04±0,04	0,05	1				0,48±0,31	0,3	1
	REALTIME HS	0,04±0,08	0,09	0,94	0,48±0,31	1	0,95			

Tabella n. 10. Matrice tampone nasale: confronto tra metodiche diagnostiche nel complesso dell'infezione e nei tre periodi di infezione.

		GOLD STANDARD								
		PCR			REALTIME HC			REALTIME HS		
		K =	Se =	Sp =	K =	Se =	Sp =	K =	Se =	Sp =
TUTTI I CAMPIONI	PCR				0,17±0,05	0,95	0,29	0,24±0,05	0,96	0,32
	REALTIME HC	0,17±0,05	0,38	0,93				0,85±0,05	0,82	1
	REALTIME HS	0,24±0,05	0,47	0,54	0,85±0,05	1	0,9			
GPI 0-3	PCR				0,48±0,12	1	0,58	0,53±0,12	1	0,61
	REALTIME HC	0,48±0,12	0,54	1				0,94±0,06	0,92	1
	REALTIME HS	0,53±0,12	0,59	1	0,94±0,06	1	0,96			
GPI 7-21	PCR					1			1	
	REALTIME HC		0,96					0,91±0,06	0,92	1
	REALTIME HS		0,57		0,91±0,06	1	0,9			
GPI 28-49	PCR				-0,05±0,08	0,6	0,23	0,07±0,01	0,82	0,29
	REALTIME HC	-0,05±0,08	0,1	0,8				0,54±0,15	0,45	1
	REALTIME HS	0,07±0,01	0,31	0,8	0,54±0,15	1	0,82			

Tabella n.11. Matrice tampone orale: confronto tra metodiche diagnostiche nel complesso dell'infezione e nei tre periodi di infezione.

		GOLD STANDARD								
		PCR			REALTIME HC			REALTIME HS		
		K =	Se =	Sp =	K =	Se =	Sp =	K =	Se =	Sp =
TUTTI I CAMPIONI	PCR				0,43±0,07	1	0,42	0,53±0,07	1	0,42
	REALTIME HC	0,43±0,07	0,66	1				0,86±0,04	0,89	1
	REALTIME HS	0,53±0,07	0,74	1	0,86±0,04	1	0,85			
GPI 0-3	PCR				0,71±0,11	1	0,69	0,71±0,11	0,8	1
	REALTIME HC	0,71±0,11	0,8	1				1	1	1
	REALTIME HS	0,71±0,11	0,8	1	1	1	1			
GPI 7-21	PCR					1			1	
	REALTIME HC		0,99						0,99	
	REALTIME HS		1			1				
GPI 28-49	PCR				0,06±0,03	1	0,2	0,18±0,07	1	0,26
	REALTIME HC	0,06±0,03	0,15	1				0,46±0,14	0,38	1
	REALTIME HS	0,18±0,07	0,39	1	0,46±0,14	1	0,77			

Tabella n. 12. Matrice tampone auricolare: confronto tra metodiche diagnostiche nel complesso dell'infezione e nei tre periodi di infezione.

Nella **tabella n. 9** i valori di K tra RT-PCR Classica e RT-PCR RealTime con sonda sono *good* nel confronto durante l'infezione. Si osserva come nel primo periodo d'infezione e nella fase di alta viremia i valori raggiungano il *very good* mentre nella coda viremica siano solamente *fair*. Stesso andamento, seppure con valori costantemente più bassi, è riportato dal confronto nelle **tabelle n. 11 e 12**. La **tabella n. 10** riporta un basso agreement tra le metodiche pure nella fase di alta viremia, raggiungendo come miglior valore un *fair* nel periodo GPI 0-3.

10.4 Comparazione tra le matrici

Il seguente istogramma (**grafico n. 6**) fornisce una visione d'insieme sull'andamento delle positività e negatività (con metodica RT-PCR RealTime con sonda) degli animali durante l'infezione per le diverse matrici.

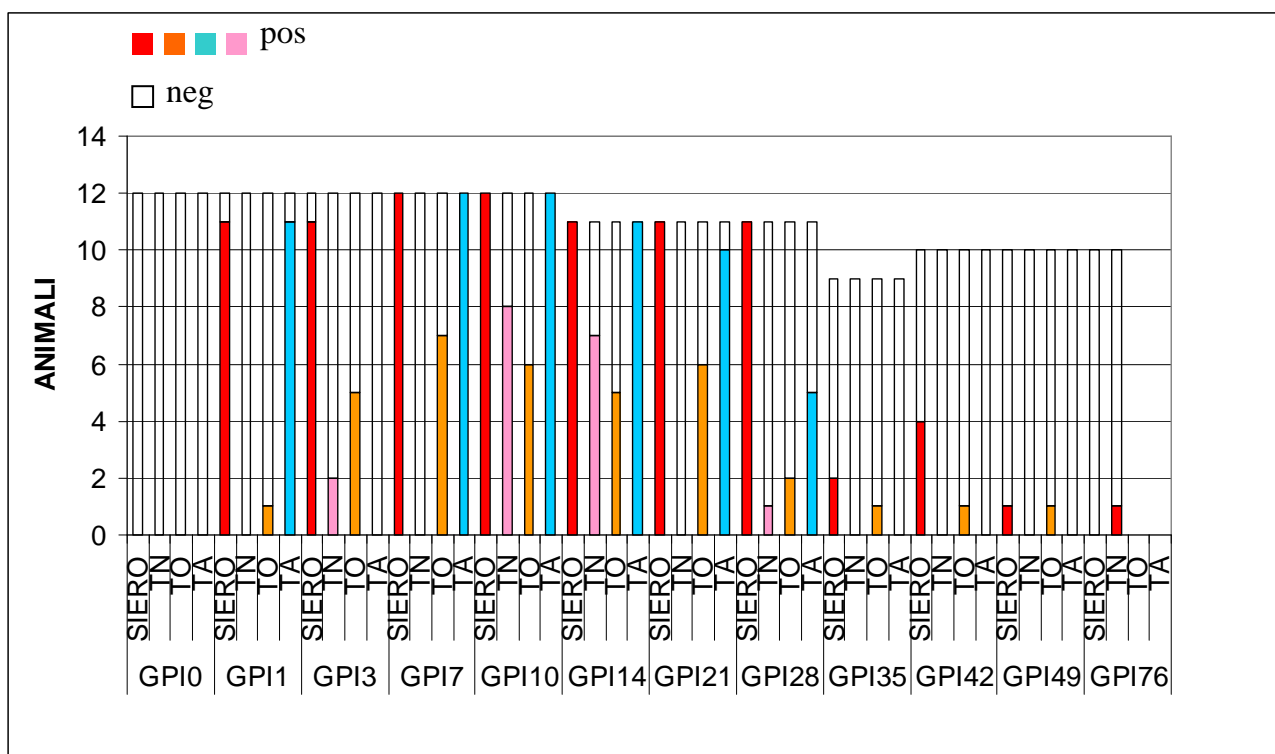


GRAFICO n. 6

In seguito si è presa in considerazione una metodica alla volta e sono stati confrontati i risultati ottenuti per le differenti matrici. Si sono calcolati sensibilità, specificità e valore di

K di Cohen (con il software SPSS for Windows, Rl. 12.0.1. 2001, Chicago:SPSS inc.), ponendo alternativamente una matrice come gold standard e confrontandola con le altre.

La misura della concordanza tra i metodi è stata interpretata secondo la scala seguente:

- $\leq 0,20$ poor
- 0,21 – 0,40 fair
- 0,41 – 0,60 moderate
- 0,61 – 0,80 good
- 0,81 – 1,00 very good

Le **tabelle n. 13, 14, 15** rappresentano i risultati ottenuti.

		GOLD STANDARD											
		SIERO			TN			TO			TA		
		K	Se	Sp	K	Se	Sp	K	Se	Sp	K	Se	Sp
TUTTI I CAMPIONI	SIERO				0,34±0,08	0,96	0,33	0,66±0,09	0,97	0,62	0,74±0,09	0,96	0,78
	TN	0,34±0,08	0,71	0,83				0,41±0,08	0,74	0,79	0,34±0,08	0,71	0,83
	TO	0,66±0,09	0,91	0,83	0,41±0,08	0,93	0,43				0,77±0,08	0,93	0,94
	TA	0,74±0,09	0,96	0,78	0,34±0,08	0,96	0,33	0,77±0,08	0,99	0,71			
GPI 0-3	SIERO				0,37±0,13	0,93	0,48	0,7±0,12	0,95	0,71	0,87±0,09	0,96	0,91
	TN	0,37±0,13	0,56	0,91				0,41±0,14	0,59	0,86	0,37±0,13	0,56	0,91
	TO	0,7±0,12	0,84	0,91	0,41±0,14	0,87	0,57				0,7±0,12	0,84	0,91
	TA	0,87±0,09	0,96	0,91	0,37±0,13	0,93	0,48	0,7±0,12	0,95	0,71			
GPI 7-21	SIERO						1			1			1
	TN		0,87							0,87			0,87
	TO		1				1						1
	TA		1				1			1			
GPI 28-49	SIERO				0,2±0,13	0,91	0,28	0,49±0,17	0,93	0,5	0,48±0,18	0,91	0,57
	TN	0,2±0,13	0,61	0,71				0,29±0,15	0,65	0,7	0,2±0,13	0,61	0,71
	TO	0,49±0,17	0,84	0,71	0,29±0,15	0,86	0,41				0,78±0,12	0,91	1
	TA	0,48±0,18	0,91	0,57	0,2±0,13	0,91	0,28	0,78±0,12	1	0,7			

Tabella n. 13 Rt-pcr classica: confronto tra matrici diagnostiche nel complesso dell'infezione e nei tre periodi di infezione.

		GOLD STANDARD											
		SIERO			TN			TO			TA		
		K	Se	Sp	K	Se	Sp	K	Se	Sp	K	Se	Sp
TUTTI I CAMPIONI	SIERO				0,15±0,04	0,95	0,37	0,29±0,06	0,94	0,43	0,7±0,06	1	0,69
	TN	0,15±0,04	0,25	0,97				0,3±0,09	0,36	0,91	0,24±0,06	0,29	0,96
	TO	0,29±0,06	0,44	0,91	0,3±0,09	0,65	0,75				0,36±0,08	0,49	0,88
	TA	0,7±0,06	0,79	1	0,24±0,06	0,9	0,53	0,36±0,08	0,83	0,59			
GPI 0-3	SIERO				0,05±0,08	0,75	0,39	0,32±0,12	0,91	0,5	0,82±0,09	1	0,81
	TN	0,05±0,08	0,14	0,92				0,44±0,16	0,36	1	-0,02±0,1	0,1	0,87
	TO	0,32±0,12	0,45	0,92	0,44±0,16	1	0,77				0,33±0,14	0,47	0,87
	TA	0,82±0,09	0,86	1	-0,02±0,1	0,5	0,45	0,33±0,14	0,82	0,58			
GPI 7-21	SIERO					1			1			1	
	TN		0,39					0,16±0,16	0,47	0,68	0,03±0,03	0,4	1
	TO		0,5		0,16±0,16	0,6	0,56				0,05±0,05	0,51	1
	TA		0,97		0,03±0,03	1	0,04	0,05±0,05	1	0,05			
GPI 28-49	SIERO				0,07±0,06	1	0,58	0,27±0,13	0,83	0,64	0,32±0,12	1	0,65
	TN	0,07±0,06	0,06	1				-0,05±0,04	0	0,97	0,3±0,24	0,2	1
	TO	0,27±0,13	0,29	0,95	-0,05±0,04	0	0,84				0,26±0,2	0,4	0,88
	TA	0,32±0,12	0,95	1	0,3±0,24	1	0,89	0,26±0,2	0,17	0,91			

Tabella n. 14 Rt-pcr realtime hc: confronto tra matrici diagnostiche nel complesso dell'infezione e nei tre periodi di infezione.

		GOLD STANDARD											
		SIERO			TN			TO			TA		
		K	Se	Sp	K	Se	Sp	K	Se	Sp	K	Se	Sp
TUTTI I CAMPIONI	SIERO				0,14±0,05	0,93	0,33	0,26±0,07	0,9	0,39	0,8±0,06	1	0,76
	TN	0,14±0,05	0,29	0,94				0,28±0,08	0,38	0,88	0,19±0,06	0,31	0,93
	TO	0,26±0,07	0,52	0,84	0,28±0,08	0,7	0,66				0,25±0,08	0,52	0,02
	TA	0,8±0,06	0,88	1	0,19±0,06	0,89	0,42	0,25±0,08	0,8	0,46			
GPI 0-3	SIERO				0,05±0,08	0,75	0,39	0,26±0,13	0,83	0,48	0,82±0,09	1	0,81
	TN	0,05±0,08	0,14	0,92				0,4±0,15	0,33	1	-0,02±0,1	0,1	0,87
	TO	0,26±0,13	0,45	0,85	0,4±0,15	1	0,74				0,28±0,15	0,47	0,81
	TA	0,82±0,09	0,86	1	-0,02±0,1	0,5	0,45	0,28±0,15	0,75	0,56			
GPI 7-21	SIERO					1			1			1	
	TN		0,44					0,3±0,14	0,58	0,74		0,44	
	TO		0,58		0,3±0,14	0,75	0,56					0,58	
	TA		1			1			1				
GPI 28-49	SIERO				0,05±0,08	0,67	0,5	0,29±0,14	0,75	0,59	0,64±0,11	1	0,73
	TN	0,05±0,08	0,1	0,95				-0,14±0,7	0	0,89	0,14±0,13	0,15	0,96
	TO	0,29±0,14	0,45	0,84	-0,14±0,7	0	0,67				0,12±0,16	0,38	0,73
	TA	0,64±0,11	0,65	1	0,14±0,13	0,67	0,69	0,12±0,16	0,42	0,7			

Tabella n. 15 Rt-pcr realtime hs: confronto tra matrici diagnostiche nel complesso dell'infezione e nei tre periodi di infezione.

Dalle **tabelle n. 13, 14 e 15** si vede come i valori di concordanza più alti siano quelli tra il siero ed il tampone auricolare, sia per l'infezione in toto che per i diversi periodi. Nella RT-PCR Classica come nelle RealTime con sonda il tampone nasale è la matrice con valori di *agreement* più bassi, seppure tenda nei momenti di inizio ed alta viremia ad entrare in concordanza con il tampone orale soprattutto.

11. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

11.1 Risultati di validazione delle metodiche

Per quanto riguarda la sensibilità analitica, prendendo in esame i dati riportati nelle tabelle che sintetizzano le LoD dei diversi protocolli investigati, un logaritmo separa la RT-PCR classica dalle RealTime. Questo porterebbe a dare una maggior sensibilità alla prima; tuttavia, se si osservano più attentamente le miscele di reazione, il gap si riduce in quanto la quantità di RNA introdotto in classica è 10 volte quello delle Real-time. Di questo particolare bisognerà tener conto durante la lettura della sensibilità diagnostica, onde il rischio di penalizzare le metodiche RealTime nella comparazione.

La specificità analitica risulta ottima per tutti i metodi validati, sia a livello di inclusività che di esclusività. In modo particolare si evidenzia che il ceppo E.coli beta-emolitico, preso in considerazione nella prova di esclusività e citato nella bibliografia come un pericoloso target aspecifico, non viene rilevato né dalla Real-time con sonde né in Sybr Green.

11.2 Risultati delle analisi sui campioni sperimentali

In un confronto tra le positività/negatività rinvenute nei diversi metodi si può notare come il valore della specificità diagnostica della RT-PCR classica sia inferiore a quanto ci si possa aspettare dalle prove di validazione. In RT-PCR classica si hanno casi di positività tra i campioni del prelievo pre-infezione e in quelli di controllo negativo. Questi risultati potrebbero essere ricondotti ad una effettiva scarsa specificità diagnostica, alla soggettività intrinseca nella valutazione delle bande sui gel di acrilamide (sarebbe sempre preferibile effettuare un sequenziamento sui risultati dubbi), o al semplice fatto che, essendo la RT-PCR classica utilizzata una two steps (maggiori manualità e tempi richiesti), vi sia una maggior probabilità di false positività dovute a carryover fra campioni.

Per quanto concerne la sensibilità diagnostica, questa risulta essere sicuramente sufficiente per tutti i metodi. Tuttavia, facendo nuovamente il confronto tra RT-PCR Real-Time e classica, la prima risulta penalizzata ai livelli iniziali e finali di viremia, probabilmente sempre a causa della quantità di RNA introdotto nella reazione (1 µl contro i 10 µl

rispettivamente), quindi si presume che l'aumento della quantità dell'RNA da introdurre nella miscela di reazione possa far recuperare il gap di sensibilità registrato.

Posto questo, durante la fase di alta viremia (GPI 7-21) si riscontra il massimo accordo tra le metodiche. Tale risultato era atteso, in considerazione delle differenti sensibilità diagnostiche dei metodi.

La concordanza diagnostica all'interno della stessa metodica confrontando le diverse matrici mostra che i tamponi nasali e orali sono generalmente scarsamente in accordo con le altre matrici. Siero e sangue periferico sono sostanzialmente in accordo dimostrando valori di K che vanno dal *very good* nel periodo 0-3 GPI al *good* nel complesso dell'infezione per la Classica e per la RealTime.

L'agreement tra metodiche diverse in funzione della matrice diagnostica ha mostra che sul siero si hanno i migliori valori di K che vanno dal *very good* nel periodo 0-3 GPI al *good* nel complesso dell'infezione.

Appare evidente che le matrici siero e sangue periferico da vena auricolare dimostrano la stessa affidabilità diagnostica, pertanto si possono ritenere equivalenti per questa analisi. Invece, per quanto concerne i tamponi, emerge molta variabilità nei risultati, dovuta non solo alla minore concordanza dei metodi e delle matrici, ma anche ad una variabilità nell'escrezione del virus e all'impossibilità di ottenere quantità paragonabili di campione biologico da diversi prelievi; pertanto sono da considerarsi matrici da investigare ulteriormente.

12. CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati, le metodiche utilizzate presentano buona validità anche se è importante sempre tenere sotto controllo lo stipite di PRRSv con cui si sta lavorando, in quanto le RealTime RT-PCR con sonda potrebbero avere problemi di sensibilità (dovuti al legame specifico sonda-target), poiché il virus in questione ha grande variabilità genomica ed eventi di ricombinazione tra ceppi non sono rari. Il vantaggio dell'adozione di metodi con sonde home-made quindi, come già commentato, può risultare talvolta conveniente e più efficace perché mostra una maggiore flessibilità ed adattamento alle esigenze del territorio, mentre non si può dire lo stesso di alcuni kit commerciali. Anche RT-PCR classica ha rivelato delle carenze in quanto la sua alta sensibilità si è dimostrata essere, durante il confronto con le metodiche RealTime, un probabile deficit di specificità. C'è da aggiungere inoltre che i metodi come la RT-PCR classica e la RealTime RT-PCR SybrGreen si prestano ad errori dovuti alla soggettività nell'interpretazione dell'avanzamento e intensità della banda e dei picchi di T_m rispettivamente.

In una valutazione complessiva del SybrGreen possiamo affermare che la metodica non ha incontrato grandi problematiche nelle analisi dei ceppi di campo. Un numero rilevante di inibizioni ha portato ad escluderla dai confronti con le altre metodiche. Infatti i risultati inibiti non sono stati ripetuti per mancanza di materiale disponibile (dato il poco valore quantitativo della metodica è stata ritenuta marginale la necessità di una ripetizione ai fini dei risultati dello studio).

La RealTime con sonda ha funzionato molto bene per la matrice siero giugulare mentre diversi problemi di sensibilità ci sono stati per le restanti matrici, con episodi di completa negatività dei campioni i GPI 7 e 21 per il tampone nasale e il GPI 3 per il tampone auricolare. Quindi la RealTime con sonda ha dimostrato di poter essere una metodica quantitativa oggettiva molto valida per la quantificazione del titolo virale su siero. Le matrici alternative al siero vanno invece considerate con cautela alla luce dei risultati di negatività anche in momenti di maggior espressione virale e hanno pertanto scarsa applicabilità in campo al momento.

Sicuramente il maggior pregio di questa metodica consiste nella possibilità di poter quantificare il titolo virale dell'animale, aspetto che presenta la sua utilità per i seguenti motivi:

- *screening* della circolazione virale all'interno di un allevamento endemico per PRRSv, con indagini periodiche nei diversi reparti. A differenza infatti di una semplice metodica biomolecolare qualitativa, la quantitativa permette di interpretare una positività distinguendo una piena viremia nei giorni centrali dell'infezione da una coda viremica o un inizio d'infezione o ancora da una infezione persistente. A questo proposito si precisa che la RealTime quantitativa è accompagnabile a metodiche sierologiche quantitative;
- piano di controllo per quei reparti maggiormente a rischio come il magronaggio (momento in cui sparisce l'immunità materna) e la sala fecondazione (se viremia ci sarà rischio di aborti);
- *screening* degli animali entranti in azienda. Il discriminare un inizio viremia da una coda viremica permette di decidere di conseguenza le tempistiche e i metodi di acclimatamento. Ed è proprio per la valutazione di una strategia di acclimatamento che questa metodica trova a parer mio il miglior impiego.

Miglioramenti futuri alla RT-PCR RealTime quantitativa con sonda sono:

- aumento dell'RNA di partenza. Il problema però è che la capacità dei pozzetti delle micropiastre è limitata a 10 µl. Una soluzione potrebbe essere tentare di concentrare ulteriormente i reagenti della miscela di reazione per guadagnare alcuni µl per il volume del campione di RNA;
- aumento del numero di cicli della reazione (da 40 a 45 per esempio) in modo tale da recuperare quei campioni che hanno sviluppato la loro positività oltre il ciclo 35 e di cui non si è potuto ottenere il valore di titolo virale.

Una prospettiva futura di questo lavoro sarà quella di sequenziare tutti i campioni risultati positivi in RT-PCR Classica e negativi in SybrGreen e sonda, per verificare effettivamente la presenza di falsi positivi in RT-PCR Classica.

BIBLIOGRAFIA

Albina E., *Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview*, Vet. Microbiol. 55 (1997), 309-316.

Allende R., Lewis T.L., Lu Z., Rock D.L., Kutish G.F., Ali A., Doster A.R., Osorio F.A., *North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions*, J. Gen. Virol. 80 (1999), 307-315.

Allende R., Laegreid W. W., Kutish G. F., Galeota J. A., Wills R. W., Osorio F. A., *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Description of Persistence in Individual Pigs upon Experimental Infection*†, Journal Of Virology (2000), Vol. 74, No. 22, p. 10834-10837.

Andreasen M., *Experiences with eradication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Danish swine herds*, Vet. Res. 31 (2000), 91-92.

Balka G., Hornyák Á., Dán Á., Ladinig A., Biksi I., Rusvai M., *PriProET based melting point analyses on PRRSV positive field samples*, Molecular and Cellular Probes (2010), 1-4.

Baron T., Albina E., Leforban Y., Madec F., Guilmoto H., Plana-Duran J., Vennier P., *Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation*, Ann. Rech. Vet. 23 (1992), 161-166.

Beltran-Alcrudo D., Lubroth J., (2008), 2:1-5. Disponibile all'indirizzo: http://www.fao.org/docs/eims/upload/235243/Focus_ON_2_07.pdf.

Benfield D.A., Nelson E., Collins J.E., Harris L., Goyal S.M., Robison D., Christianson W.T., Morrison R.B., Gorcyca D., Chladek D., *Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332)*, J. Vet. Diagn. Invest. 4 (1992), 127-133.

Benfield D.A., Nelson J., Rossow K., Rowland R.R., Lawson S.R., Steffen M., Collins M., *Pathogenesis and persistence of PRRS*, Proceedings Lemna Conference (1998), 169-186.

- Bertacchini F., Campani I., *Manuale di allevamento suino*, Edagricole (2001).
- Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M., *Tecniche di produzione animale* 2nd edition, Liviana editrice (1993), 310-322.
- Blaha T., *The “colorful” epidemiology of PRRS*, Vet. Res. 31 (2000), 77-83.
- Blanquefort P., Benoit F., *Eradication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus in 25 herds in “Pays de la Loire” (France)*, Vet. Res. 31 (2000), 94-95.
- Bøtner A., *Diagnosis of PRRS*, Vet. Microbiol. 55 (1997), 295-301.
- Bøtner A., Nielsen J., Oleksiewicz M.B., Storgaard T., *Heterologous challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine virus: no evidence of reactivation of previous European-type PRRS virus infection*, Vet. Microbiol. 68 (1999), 187-195.
- Cancel-Tirado S., Evans R.B. Yoon K., *Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection*, Vet Immunol Immunopathol. (2004), 102(3): 249-62.
- Candotti P., Rota-Nodari S., Leotti G., Longo S., Joisel F., *Relationship between piglet PRRS seroprevalence at the end of nursery and re production disorders due to PRRS in sows*, 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark (2006), Volume 1: 54.
- Cano J. P., Dee S. A., Murtaugh M. P., Rovira A., Morrison R. B., *Infection dynamics and clinical manifestations following experimental inoculation of gilts at 90 days of gestation with a low dose of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, The Canadian Journal of Veterinary Research (2009), 73:303-307.
- Carvalho L.F., Segalés J., Pijoan C., *Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on subsequent Pasteurella multocida challenge in pigs*, Vet. Microbiol. 55 (1997), 241-247.

Cho J.G. e Dee S.A., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, *Theriogenology* 66 (2006), 655-662.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, et al., *Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars*, *J Vet Diagn Invest* (1995), 7:456-464.

Collins J.E., Benfield D.A., Christianson W.T., Harris L., Hennings J.C., Shaw D.P., Goyal S.M., McCullough S., Morrison R.B., Joo H.S., et al., *Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs*, *J. Vet. Diagn. Invest.* 4 (1992), 117-126.

Cordioli P., *Prrs, una sindrome da conoscere a fondo*, in: *Rivista di suinicoltura, Edagricole* 5 (2003), 59-60.

Cuartero L., Dee S., Deen J., Ruiz A., Pijoan C., *Association between clinical signs and high serum titers of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in nursery pigs under field conditions*, *J Swine Health Prod.* (2002), 10: 119-122.

Dee S.A., *Area spread of PRRSV: End of story?*, Allen D. Leman Conference, St. Paul (MN) (2007), pp 3-11.

Dee S.A., Deen J., Cano J. P., Batista L., Pijoan C., *Further evaluation of alternative air-filtration systems for reducing the transmission of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus by aerosol*, *The Canadian Journal of Veterinary Research* (2006), 70:168–175

Dee S.A., Joo H.S., *Strategies to control PRRS: A summary of field and research experiences*, *Vet. Microbiol.* 55 (1997), 347-353.

Dee S.A., Molitor T.W., Philips R.E., *Elimination of PRRS virus in five pig farms using a test and removal procedure in the breeding herds*, *Vet. Res.* 31 (2000), 93-94.

Dewey C, Charbonneau G, Carman S, Hamel A., Nayar G., Friendship R., Eernisse K., Swenson S., *Lelystad-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) identified in Canadian swine*, Can Vet J (2000), 41: 493-494.

Díaz I., Mateu E., *Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN- γ , IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs*, Vet Immunol Immunopathol (2005), 106: 107-112.

Drew T.W., *A review of evidence for immunosuppression due to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*, Vet. Res. 31 (2000), 27-39.

Duan X.B., Nauwynck H.J., Favoreel H.V., Pensaert M.B., *Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on alveolar macrophages*, J. Virol. 72 (1998), 4520-4523.

Edwards S., Robertson I.B., Wilesmith J.W., *PRRS blue-eared pig disease in Great Britain*, Am. Assoc. Swine Pract. News 4 (1992), 32-36.

Ferrin N.H., Fang Y., Johnson C.R., Murtaugh M.P., Polson D.D., Torremorell M., Gramer M.L., Nelson E.A., *Validation of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, Clin Diagn Lab Immunol. (2004), 11(3):503-14.

Forsberg R., *Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes*, Mol. Biol. Evol. (2005), 22: 2131-2134.

Galina L., Pijoan C., Sitjar M., Christianson W.T., Rossow K., Collins J.E., *Interaction between Streptococcus suis serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets*, Vet. Rec. 134 (1994), 60-64.

Galina L., Pijoan C., Sitjar M., Christianson W.T., Rossow K., Collins J.E., *Interaction between Streptococcus suis serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets*, Vet. Rec. 134 (1994), 60-64.

Gherpelli M., *La gestione della scrofetta*, Point Veterinaire Italie (2004).

Hennings J.C., *The pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in the boar*, Vet. Res. 31 (2000), 57-58.

Hermann JR. Munoz-Zanzi CA. Roof MB. Burkhart K. Zimmerman JJ., *Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose*, Vet. Microbiol. (2005), 110(1-2):7-16.

Hirose O., Shibata I., Kudou H., Samegai Y., Yoshizawa S., Ono M., Nishimura M., Hiroike T., Kageyama K., Sakano T., *Experimental infection of SPF piglets with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Viruses isolated from two farms*, NII - Electronic Library Service - J. Vet. Med. Sci. (1995), 57(6): 991-995.

Hoffmann B., Depner K., Schirrneier H. & Beer M., *A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses*, J. Virol. Met. (2006), **136**, 200–209.

Kang I., Ha Y., Kim D., Oh Y., Cho K.-D., Lee B.-H., Lim J., Kim S.-H., Kwon B., Chae C., *Localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary glands of experimentally infected sows*, Veterinary Science 88 (2010), 304–306.

Key S., Moreau I.A., Provis P., *A retrospective study of PRRS diagnostic results from routine serologic testing of seven PRRS naïve herds*, Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians (2002), pp. 147-148.

Keffaber KK., *Reproductive failure of unknown etiology*, Am Assoc Swine Pract News (1989), 1:1-10.

Kristensen K.S., Bøtner A., Takai H., Nielsen J.P., Jorsal S.E., *Experimental airborne transmission of PRRS virus*, Vet. Microbiol. 99 (2004), 197-202.

Labarque G., Van Reeth K., Nauwynck H., Drexler C., Van Gucht S., Pensaert M., *Impact of diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy*, Vaccine (2004), 22: 4183-4190.

Labarque G.G., Nauwynck H.J., Van Reeth K., Penseart M.B., *Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs*, J Gen Virol. (2000), 81:1327-1334.

Lamontagne L., Page C., Laroche R., Magar R., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8high T cells*, Viral Immunology (2003), 16(3): 395-406.

Le Potier M.F., Blanquefort P., Morvan E., Albina E., *Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the French "Pays de la Loire" region*, Vet. Microbiol. 55 (1997), 355-360.

Lewis CR., Ait-Ali T., Clapperton M., Archibald AL., Bishop S., *Genetic perspectives on host responses to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)*, Viral Immunology (2007), 20(3):343-58.

Loemba H.D., Mounir S., Mardassi H., Archambault D., Dea S., *Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, Arch Virol (1996) 141: 751-761.

Lopez O.J., Osorio F.A., *Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity*, Vet. Immunol. Immunopathol. (2004), 102: 155–163.

Lurchachaiwong W., Payungporn S., Srisatidnarakul U., Mungkundar C., Theamboonlers A. & Poovorawan Y., *Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR*, Lett Appl Microbiol. (2008), **46**, 55-60.

Martelli P., Cordioli P., Alborali L.G., Gozio S., De Angelis E., Ferrari L., Lombardi G., Borghetti P., *Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain*, Vaccine (2007), 25(17): 3400-3408.

- Mateu E., Diaz I., *The challenge of PRRS immunology*, The Veterinary Journal (2007), 10.1016-05.022.
- Meier W., Wheeler J., Husmann R.J., Osorio F., Zuckermann F.A., *Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus*, Vet. Res. 31 (2000), 41.
- Meier W.A., Galeota J., Osorio F.A., Husmann R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann F.A., *Gradual development of the interferon-(response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination*, Virology (2003), 309:18–31.
- Mengeling W.L., Lager K.M., *A brief review of procedures and potential problems associated with the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome*, Vet. Res. 31 (2000), 61-69.
- Mengeling W.L., Lager K.M., Vorwald A.C., Clouser D.F., *Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome*, Vet. Microbiol. (2003a), 93, 25–38.
- Mengeling W.L., Lager K.M., Vorwald A.C., Koehler K.J., *Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, Vet. Microbiol. (2003b), 93, 13–24.
- Meulenbergh J.J.M., Bos-de Ruijter J.N.A., Wensvoort G., Moormann R.J.M., *Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive respiratory syndrome virus*, J. Virol. 72 (1998), 380-387.
- Meulenbergh J.J.M., Petersen den Besten A., de Kluyver E., van Nieuwstadt A., Wensvoort G., Moormann R.J.M., *Molecular characterization of Lelystad virus*, Vet. Microbiol. 55 (1997), 197-202.
- Meulenbergh J.J.M., *PRRSV, the virus*, Vet. Res. 31 (2000), 11-21.
- Molitor T.W., Bautista E.M., Choi C.S., *Immunity to PRRSV: Double-edged sword*, Vet. Microbiol. 55 (1997), 265-276.

Mortensen S., Stryhn H., Sogaard R., Boklund A., Stark K.D., Christensen J., Willeberg P., *Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus*, *Prev. Vet. Med.* (2002), 53: 83-101.

Murtaugh M.P., Xiao Z., Zuckermann F.A., *Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection*, *Viral Immunol.* (2002), 15, 533-547.

Nauwynck H. J., Duan X., Favoreel H. W., Van Oostveldt P., Pensaert M. B., *Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis*, *Journal of General Virology* (1999), 80, 297-305.

Nauwynck H., Duan X., Pensaert M., *PRRSV-macrophage interaction and putative receptors*, *Vet. Res.* 31 (2000), 22.

Nelsen C.J., Murtaugh M.P., Faaberg K.S., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution of two continents*, *J. Virol.* 73 (1999), 270-280.

Nelson E.A., Christopher-Hennings J., Benfield D.A., *Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus*, *J. Vet. Diagn. Invest.* (1994), 6: 410-415.

Neumann E, Kliebestein JB, Johnson CD, Mabry JW., Bush EJ., Seitzinger AH., Green AL., Zimmerman JJ., *Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States*, *J Am Vet Med Assoc.* (2005), 227: 385-392.

Nodelijk G., *Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis: a review*, *Vet. Q.* (2002), 24: 95-100.

OIE Terrestrial Manual (2008), capitolo 1.1.5: “ Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases.”

Oleksiewicz M.B., Bøtner A., Madsen K.G., Storgaard T., *Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes*, *Vet. Microbiol.* (1998), **64**, 7-22.

Osorio F.A., Galeota J.A., Nelson E., Brodersen B., Doster A., Wills R., Zuckermann F., Laegreid W.W., *Passive transfer of virus specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity*, *Virology* (2002), 302: 9–20.

Otake S., Dee S.A., Jacobson L., Torremorell M., Pijoan C., *Evaluation of aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under controlled field conditions*, *Vet. Rec.* 150 (2002), 804-808.

Persia D., Pacciarini M.L., Cordioli P., Sala G., *Evaluation of three RT-PCR assays for the detection of porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples*, International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology, Salsomaggiore (PR), 04-07/07/2001.

Pitkin A., Deen J., Dee S., *Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, *The Canadian Journal of Veterinary Research* (2009), 73: 298-302.

Plana-Duran J., Vayreda M., Villarasa J., Bastons M., Rosell R., Martinez M., San Gabriel A., Pujols J., Badiola J.L., Ramos J.A., et al., *Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease*, *Vet. Microbiol.* 33 (1992), 203-211.

Pol J.M.A., van Leengoed L.A.M.G., Stockhofe N., Kok G., Wensvoort G., *Dual infection of PRRSV/influenza or PRRSV/Actinobacillus pleuropneumoniae in the respiratory tract*, *Vet. Microbiol.* 55 (1997), 259-264.

Poli G., Cocilovo A., Dall'Ara P., Martino P.A., Ponti W., *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*, II edizione UTET (1998), pp 342.

Prieto C., Castro J.M., *Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in gestating sows*, *Vet. Res.* 31 (2000), 56-57.

Prieto C., Castro J.M., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review*, *Theriogenology* 63 (2005), 1-16.

Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM, Molitor TW., Murtaugh MP., Morrison RB., Benfield DA., Collins JE., *Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs*, J Vet Diagn Invest (1994), 6:3-12.

Royae A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzada-Nova G., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., Lunney J.K., *Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination*, Vet. Immunol. Immunopathol. (2004), 102, 199-216.

Snidjer E.J., Brinton M.A., Faaberg K.S., Godeny E.K., Gorbalenya A.E., MacLachlan N.J., Mengeling W.L., Plagemann P., *Family Arteriviridae In Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. Edited by C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberg, L.A. Ball. London, Elsevier/Academis Press (2004).*

Software SPSS for Windows, Rl. 12.0.1. 2001, Chicago:SPSS inc.

Solano G.I., Segalés J., Collins J.E., Molitor T.W., Pijoan C., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with Haemophilus parasuis*, Vet. Microbiol. 55 (1997), 247-257.

Stadejeck T., Oleksiewicz M., Stankevicius A., Potapchuk D., Scherbakov A., *Molecular epidemiology of EU-genotype PRRSV in Europe: Clues to PRRSV emergence and implications for disease control*, Proceedings of the 5th International Symposium on emerging and re-emerging pig diseases. Krakow (2007), pp. 168.

Suarez P., Diaz-Guerra M., Prieto C., Esteban M., Castro J.M., Nieto A., Ortin J., *Open reading frame 5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus as a Cause of Virus-induced Apoptosis*, J. Virol. 70 (1996), 2876-2882.

Suarez P., *Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus*, Vet. Res. 31 (2000), 47-55.

Sur J.H., Doster A.R., Christian J.S., Galeota J.A., Wills R.W., Zimmerman J.J., Osorio F.A., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis and induces germ cell death by apoptosis*, J. Virol. 71 (1997), 9170-9179.

Sur J.H., Doster A.R., Galeota J.A., Wills R.W., Osorio F.A., *PRRSV: Study of in vivo cell tropism and virus-induced apoptosis by in situ detection techniques*, Vet. Res. 31 (2000), 58-59.

Terpstra C., Wensvoort G., Pol J.M., *Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled*, Vet. Quart. 13 (1991), 131-136.

Thacker E.L., Halbur P.G., Thacker B.J., *Effect of vaccination on dual infection with Mycoplasma hyopneumoniae and PRRSV*, Vet. Res. 31 (2000), 60.

Therrien D., St-Pierre Y., Dea S., *Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells*, Arch. Virol. (2000), 145: 1099-1116.

Trincado C., Dee S., Rossow K., Halvorson D., Pijoan C., *Evaluation of the role of mallard ducks as vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, Vet. Rec. (2004), 154: 233-237.

Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M., *Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus, a clinical and virological study*, Vet. Microbiol. (1996), 48:325-335.

Van Reeth K., Labarque G., Nauwynck H., Pensaert M., *Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity*, Res. Vet. Sci. (1999), 67:47-52.

Van Reeth K., *Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection*, Vet. Microbiol. 55 (1997), 223-230.

Weigel R.M., Firkins L.D., Scherba G., *Prevalence and risk factors for infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in swine herds in Illinois (USA)*, Vet. Res. 31 (2000), 87-88.

Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M., ter Laak E.A., Bloemraad M., de Kluyver E.P., Kragten C., van Buiten L., den Besten A., Wagenaar F., et al., *Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus*, Vet. Quart. 13 (1991), 121-130.

Wills R.W., Doster A.R., Galeota J.A., Sur J.H., Osorio F.A., *Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, J. Clin. Microbiol. 41 (2003), 58-62.

Yoon I.J., Joo H.S., Goyal S.M., Molitor T.W., *A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera*, J. Vet. Diagn. Invest (1994), 6: 289-292.

Yoon K.J., Christopher-Hennings J., Nelson E.A., *Diagnosis of PRRS Virus*, PRRS Compendium 2nd edition. Ed: Zimmerman JJ, Yoon KJ. Iowa (2003).

Yoon K.J., Zimmerman J.J., Swenson S.L., McGinley M.J., Eernisse K.A., Brevik A., Rhinehart L.L., Frey M.L., Hill H.T., Platt K.B., *Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection*, J. Vet. Diagn. Invest. (1995), 7, 305-312.

Yu M., Liu X., Sun L., Chen C., Ma G., Kitamura Y., Gao G.F., Liu W., *Subcellular localization and topology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus E protein*, Virus Research 152 (2010), 104-114.

Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M., *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus)*, Diseases of swine 9th edition, Blackwell Publishing (2006), 387-417.

Zimmerman J.J., Yoon K.-J., Wills R.W., Swenson S.L., *General overview of PRRSV: A perspective from the United States*, Vet. Microbiol. 55 (1997), 187-196.

APPENDIX 1

RT-PCR Classica two steps

Questo protocollo è derivato dalla pubblicazione di Persia et al. (2001). A questo protocollo iniziale sono state apportate delle modifiche in termini di diversa TaqPolimerasi prescelta nonché di metodo di rivelazione, mentre nessuna modifica è stata adottata a livello del profilo termico. Le sequenze dei primers, tratte dalla pubblicazione sopra citata, permettono di individuare sia la presenza del ceppo americano sia di quello europeo (il più diffuso nel nostro paese) grazie alla presenza di un primer senso comune e 2 primers antisenso specifici ciascuno per la sequenza dell'ORF 7, altamente conservato del genoma di PRRSv sia nel ceppo europeo che americano. La dimensione attesa dell'amplificato è pari a 181bp nel caso dello stipite europeo ed a 282bp nel caso di stipite americano.

Il programma di retro-trascrizione impiegato è:

- Step 1: RETROTRASCRIZIONE 42°C/60 min
- Step 2: INATTIVAZIONE 70°C/10 min
- RAFFREDDAMENTO 4°C / infinito

I reagenti e le relative concentrazioni impiegati nella miscela di reazione per la retro-trascrizione sono indicati nella seguente tabella.

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 reazione
Acqua ultrapura sterile con DEPC	/	4,5125 µl
PCR Buffer 10X senza MgCl ₂	1X	2,5 µl
MgCl ₂ 25 Mm	1,8 Mm	1,8 µl
dNTPs Mix 10 Mm	200 µM	0,5 µl
Dtt 100 Mm	1 Mm	0,25 µl
PRRS Rev-RT 25 µM	5 µM	5 µl
RNAse inhibitor 40 U/µl	12,5 U	0,3125µl
Superscript II 50 U/µl	6,25 U	0,125 µl

VOLUME TOTALE	
Vortexare la mix preparata per pochi secondi e centrifugare brevemente. Distribuire la mix in aliquote da 15µl in provette per PCR da 0,2 ml.	15 µl
VOLUME CAMPIONE RNA	
Aggiungere l'RNA nelle rispettive provette	10 µl
VOLUME FINALE DI REAZIONE	25 µl

Il programma di amplificazione impiegato è:

- Step 1: attivazione Taq 95°C / 10 min
- Step 2: DENATURAZIONE 95°C / 20 sec
- Step 3: ANNEALING 55°C / 30 sec
- Step 4: ESTENSIONE 72°C / 30 sec
- NUMERO DI CICLI da Step 2 a Step 4 40
- ESTENSIONE FINALE 72°C / 5 min
- RAFFREDDAMENTO 4°C / infinito

I reagenti e le relative concentrazioni impiegati nella miscela di reazione per la PCR sono indicati nella seguente tabella.

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 reazione
Acqua ultrapura sterile con DEPC	/	30,9 µl
PCR Buffer 10X senza MgCl ₂	0,5X	2,5 µl
MgCl ₂ 25Mm	1,8 Mm	3,6 µl
dNTPs Mix 10Mm	200 µM	1 µl
Primer DIR COMUNE 25 µM	0,25 µM	0,5µl
Primer REV AME 25 µM	0,25 µM	0,5µl
Primer REV EUR 25 µM	0,25 µM	0,5µl
Taq polimerase 5 U/µl	2,5 U	0,5µl

VOLUME TOTALE	
Vortexare la mix preparata per pochi secondi e centrifugare brevemente. Distribuire la mix in aliquote da 40µl in provette per PCR da 0,2 ml.	40 µl
VOLUME CAMPIONE Cdna	
Aggiungere il Cdna nelle rispettive provette	10 µl
VOLUME FINALE DI REAZIONE	50 µl

Validazione

Vengono riportati in **tabella n. 16 e 17** i risultati delle prove di validazione (sensibilità e specificità analitiche).

		RT-PCR classica
matrice biologica	Marc 145 infette ceppo Eu	10^{-5} (pari a $10^{0,6}$ copie/µl)
	Marc 145 infette ceppo AM	10^{-6}
	Siero	10^{-6} (pari a $10^{0,05}$ copie/µl)
	polmone	$10^{-3}/10^{-4}$

TABELLA n. 16: valori delle LoD (limit of detection) per le diverse matrici.

Ceppo PRRS europeo di campo →	1	2	3	4
RT-PCR classica	pos	pos	pos	dubbio

TABELLA n. 17: esito della prova di inclusione in lisati di cellule Marc145 infettate con 4 ceppi di campo diversi geneticamente, raccolti e caratterizzati in precedenti studi di epidemiologia molecolare.

L'esito della prova di esclusione è di completa negatività dei campioni non target esaminati.

APPENDIX 2

RealTime RT-PCR Commerciale

La descrizione di questo protocollo, denominato TaqMan NA and Eu PRRSV reagents and XenorNA control (commercializzato da Ambion) si basa sulla documentazione fornita da Applied Biosystems quale supporto di validazione del metodo, ed in particolare sul documento redatto da John El-Attrache et al. "High Throughput isolation and detection of North-American and European Porcine Reproductive and respiratory virus by Real-Time PCR". Le sequenze dei primers e delle sonde, assoggettate a brevetto di Applied Biosystems perciò qui non disponibili, sono comunque disegnate sull'ORF 7. Si tratta di una RT-PCR triplex poiché nella mix sono presenti la sonda per il ceppo europeo (VIC-BHQ1), quella per il ceppo americano (FAM- BHQ1) e la sonda per il controllo esogeno aggiunto in fase di estrazione XenorNA (Quasar 670-BHQ2).

Il programma di amplificazione impiegato è il seguente :

- Step 1: RETROTRASCRIZIONE 48°C /30min
- Step 2: ATTIVAZIONE Taq 95°C / 10 min
- Step 3: DENATURAZIONE 95°C / 15 sec
- Step 4: ANNEALING ed ESTENSIONE 60°C / 1min
- NUMERO DI CICLI da Step 2 a Step 4 40

I reagenti e le relative concentrazioni impiegati nella miscela di reazione per la retro trascrizione/PCR sono indicati nella tabella.

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 REAZIONE
2X Multiplex RT-PCR Buffer	1X	12,5 µl
10X PRRSV Primer Probe Mix	1X	2,5 µl
20X Multiplex Enzyme Mix	1X	1,25 µl
Nuclease-free Water	qb	0,75 µl
Vortexare e centrifugare la mix preparata per pochi secondi. Distribuire la mix in aliquote da 17µl in micropiastra da 0,2 ml. Aggiungere l'RNA nei rispettivi pozzetti.		17µl

VOLUME CAMPIONE RNA	8 μ l
VOLUME FINALE DI REAZIONE	25 μ l

In fase di determinazione della sensibilità analitica del metodo, è stata riscontrata un'ottima sensibilità analitica con i ceppi virali di PRRS europeo ed americano di riferimento, mentre è stata registrata una situazione inaspettata di assoluta negatività sia nel caso del campione di siero sia di quello di polmone. La prova è stata ripetuta dopo nuova estrazione pensando ad una degradazione dell'RNA estratto, poi sono stati sottoposti a corsa elettroforetica gli amplificati per meglio comprendere l'entità del problema: non si è osservata nessuna amplificazione in entrambi i casi. Essendo i campioni di siero ed il polmone raccolti dallo stesso animale, già risultato al protocollo di RT-PCR classica, quanto successo poteva verosimilmente far ritenere che i primers contenuti nella miscela di reazione del kit commerciale non fossero in grado di amplificare il frammento bersaglio, verosimilmente per una mutazione nel ceppo in esame che pregiudicava l'appaiamento. Di conseguenza, purtroppo non è stato possibile eseguire con questo kit commerciale le restanti prove inerenti la specificità e ripetibilità analitica così come quelle atte a valutarne la sensibilità e specificità diagnostica in fase di infezione sperimentale.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto il mio relatore Prof. Michele Drigo per avermi dedicato così tanto tempo e pazienza durante questi mesi di preparazione nella parte sperimentale della tesi.

Ringrazio anche la Dott.ssa Alessandra Mondin per avermi chiarito gli aspetti tecnici nell'attività di laboratorio.

Ringrazio il Prof. Antonio Frangipane per gli aiuti ricevuti nella costruzione dei grafici in Excel.

Ringrazio il Dott. Giacomo Bortoletto per avermi fornito con il suo lavoro i dati di base su cui ho potuto sviluppare il mio studio.

Ringrazio il Prof. Marco Martini per avere chiarito i dubbi nella parte finale dell'analisi e tutto il dipartimento di sanità pubblica, patologia comparata e igiene veterinaria.

Ringrazio il Prof. Ferdinando Perissinotto per l'illuminazione relativa agli ultimi ritocchi tecnici.

Ringrazio la mia famiglia, i miei nonni e Agueda per l'aiuto, l'assistenza ed il supporto ricevuti nei momenti di bisogno.