

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE

Corso di laurea a ciclo unico in  
Medicina Veterinaria

# **Epidemiologia molecolare di PRRS virus in Italia**

*Relatore:*

Prof. Michele Drigo

*Correlatore:*

Dott. Giovanni Franzo

*Laureando:* Giorgio Bianchini

*Matricola:* 1001276

ANNO ACCADEMICO  
2015/2016



# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>5</b>
<b>1. Informazioni storiche</b>	<b>5</b>
<b>2. Eziopatogenesi</b>	<b>7</b>
Il Virus	7
2.1 Il Genoma	7
2.2 Eterogeneità	9
2.3 Meccanismi molecolari alla base dell'evoluzione di PRRSV	10
La Patogenesi	11
2.3 Fase acuta dell'infezione	12
2.3.1 Patogenesi in scrofe in gestazione	12
2.3.2 I verri	13
2.4 Fase persistente dell'infezione	13
2.5 Infezioni secondarie da altri patogeni	14
<b>3. Immunologia</b>	<b>15</b>
3.1 Immunosoppressione	15
3.2 Immunità umorale	15
3.3 Immunità cellulomediata	16
3.4 Cross protezione	17
3.5 Immunità materna	18
<b>4. Diagnosi</b>	<b>19</b>
4.1 Sierologia	19
4.2 Ricerca di PRRSV	20
<b>5. Epidemiologia</b>	<b>21</b>
5.1 Vie dirette di trasmissione	21
5.2 Vie indirette di trasmissione	22
5.3 Infezione persistente in animali in riproduzione	22
<b>6. Segni clinici e Lesioni</b>	<b>23</b>
Segni Clinici	23
6.1 Epidemia di PRRSV	23
6.2 PRRSV endemico	24

Lesioni	24
6.3 Lesioni macroscopiche	25
6.4 Lesioni microscopiche	25
<b>7. Controllo</b>	<b>27</b>
7.1 Monitoraggio della stabilità dell'allevamento	27
7.2 Tecniche di management	29
<b>8. Eradicazione</b>	<b>33</b>
8.1 Test e rimozione	33
8.2 Depopolamento e ripopolamento	34
8.3 Chiusura dell'allevamento	34
8.4 Eradicazione regionale	35
<b>Parte Sperimentale</b>	<b>37</b>
<b>1. Introduzione</b>	<b>38</b>
1.1 Multisite production	38
1.2 Management nel multisite production	39
<b>2. Materiali e Metodi</b>	<b>41</b>
2.1 I campioni	41
2.2 Sequenziamento	41
2.3 Analisi delle sequenze	42
<b>3. Risultati e discussione</b>	<b>43</b>
3.1 Dataset	43
3.2 Analisi delle filiere	43
3.3 Flusso genetico virale	48
<b>4. Conclusioni e prospettive future</b>	<b>52</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>53</b>
<b>Appendice</b>	<b>63</b>

# Introduzione

## 1. Informazioni storiche

Verso la fine degli anni '80 i veterinari clinici negli Stati Uniti notarono la comparsa in alcuni gruppi di suini di una malattia precedentemente sconosciuta con una situazione clinica caratterizzata da severe perdite riproduttive in scrofe in tarda gestazione, aumento del numero di suinetti nati deboli, gravi polmoniti sia nei neonati che nelle scrofe e una riduzione complessiva delle performance di accrescimento accoppiata ad un aumento della mortalità.

Una sindrome clinica simile venne descritta all'inizio degli anni '90 in Germania e si diffuse negli altri Paesi europei negli anni successivi. Nonostante vari reports che descrivevano alcuni agenti come la causa della malattia, il vero patogeno rimase sconosciuto portando la malattia ad essere chiamata "Mystery swine disease" negli Stati Uniti ed in Europa "Blue-ear pig disease" a causa della cianosi delle orecchie dei suini che l'avevano contratta.

Gli scienziati del Central Veterinary Institute (Lelystad, Olanda) furono il primo gruppo di ricercatori a soddisfare i postulati di Koch descrivendo un piccolo virus a RNA come agente eziologico, chiamato in seguito Lelystad virus. Un virus molto simile (VR-2332) venne isolato negli Stati Uniti nello stesso periodo ed un anno dopo in Canada (Stadejek et al., 2013).

Un paragone delle sequenze di questi due virus indicò che sia il virus di Lelystad, ora chiamato PRRSV tipo 1, e il virus Nord-Americano, ora chiamato PRRSV tipo 2, condividevano proprietà simili a quelli della famiglia degli *Arteriviridae*.

Una volta scoperto l'agente eziologico i ricercatori statunitensi proposero il nome di "Swine infertility and respiratory syndrome" (SIRS) mentre quelli europei preferirono l'appellativo "Porcine Reproductive and respiratory syndrome" (PRRS) con il quale la sindrome viene tuttora chiamata.

Negli ultimi anni il PRRS è diventata la malattia suina più comune al mondo. Solo negli Stati Uniti le perdite annue dovute solo al PRRS sono stimate attorno ai 664 milioni di dollari (Holtkamp et al., 2013).

Ad oggi, nonostante tutti i progressi fatti, PRRS è una patologia altamente frustrante e la nostra conoscenza dell'epidemiologia del fenomeno è molto distante dall'essere completa.

Le caratteristiche cliniche della malattia sono ben note, un'immagine globale dell'epidemiologia del fenomeno è stata disegnata e il management degli animali è stato adattato per cercare di controllare il diffondersi della malattia. Nonostante tutto ciò l'infezione da PRRSV è ancora

diffusa, il virus viene spesso ritrovato in aziende dopo tentativi di eradicazione e la risposta immunitaria indotta è ancora poco chiara.

Oltretutto l'alta eterogeneità tra gli isolati di PRRSV è probabilmente l'ostacolo più grande al controllo dell'infezione tramite l'utilizzo di vaccini commerciali poiché l'immunità indotta da un ceppo può essere solo parziale contro un ceppo diverso, anche se dello stesso genotipo.

Di conseguenza le tecniche di controllo della PRRS, come l'adozione di strette misure di biosicurezza e l'esposizione delle scrofette a specifici PRRSV che circolano in azienda, sono fondamentali per evitare una sintomatologia clinica.

Questo tipo di controllo però non può escludere test collaterali altamente sensibili che includano il giusto numero di capi.

Infine il sequenziamento e l'analisi filogenetica degli isolati sono un mezzo molto potente per monitorare la diffusione del PRRSV all'interno dell'azienda e tra aziende diverse e permettono di valutare pienamente il successo o il fallimento di un piano di controllo.

Lo scopo della mia ricerca è appunto questo: analizzare, grazie a moderne tecniche di laboratorio, le sequenze di PRRSV isolate in vari allevamenti facenti parte di una grossa filiera suina del nord Italia per poter valutare se le misure preventive, utilizzate per impedire al virus di diffondere liberamente, sono risultate essere efficaci e, qualora non lo fossero state, di investigare in futuro ciò che ha permesso un passaggio di materiale infetto non voluto, per poter implementare ulteriori azioni preventive.

## 2. Eziopatogenesi

### IL VIRUS

L'agente eziologico della PRRS è un virus ad RNA positivo, monofilamento, con envelope. Presenta caratteristiche simili a quelle della famiglia degli *Arteriviridae* (genere *Arterivirus*) che insieme ai *Coronaviridae* fa parte dell'ordine dei *Nidovirales*. Il genere *Arterivirus* comprende anche il Lactate-dehydrogenase elevating virus (LDH), il virus dell'arterite equina (EAV) e il virus della febbre emorragica delle scimmie (SHFV).

Questo tipo di virus induce una viremia prolungata con presenza di anticorpi, replica nei macrofagi e produce un'infezione persistente.

Essendo un virus con envelope la sua sopravvivenza nell'ambiente esterno è influenzata da:

- I. *Temperatura*: PRRSV può sopravvivere per più di 4 mesi a temperature che variano da -70 a -20 °C (la vitalità diminuisce all'aumentare della temperatura).
- II. *pH*: PRRSV rimane stabile tra pH 6.5 e 7.5, l'infettività si riduce se il pH è < 6.0 o > 7.65.
- III. *Esposizione a detergenti*: i solventi lipidici sono particolarmente efficienti nel distruggere l'envelope virale e inattivare la replicazione.

### 2.1 IL GENOMA

Il genoma, di lunghezza variabile tra 14.9 kb e 15.5 kb, contiene 8 "open reading frames" (ORFs) che esprimono una grande varietà di proteine strutturali e accessori.

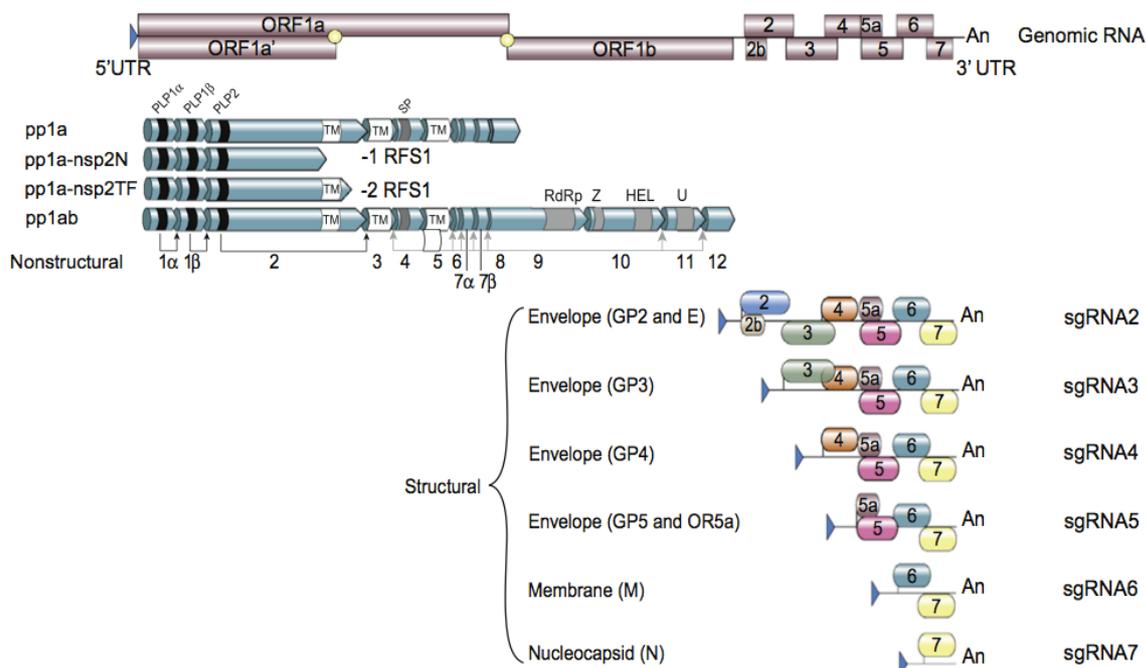


Fig. 1 Organizzazione del genoma di PRRSV (Kappes, M.A., Faaberg, K.S., 2015)

La prima porzione in 5' è non codificante (5'-untranslated region; 5'UTR), seguono direttamente due vasti "open reading frames" (ORF 1a - 1b) che occupano circa il 75% dell'intero genoma. Essi codificano due lunghe poliproteine non strutturali, pp1a e pp1ab, la seconda viene espressa dopo un "ribosomal frameshift" (RFS). Queste due vengono poi processate dando origine ad almeno 12 proteine non strutturali (nsp) che hanno funzioni di replicasi, proteasi e polimerasi necessarie per la replicazione virale.

Le proteine virali sono oggetto di molti studi poiché è stato dimostrato che almeno 4 di esse sono il target delle difese dell'ospite: N che è una proteina strutturale e 3 proteine non strutturali, nsp1, nsp2 e nsp11. Snijder et al. hanno inoltre identificato la regione nsp3-8 come potenzialmente contenente fattori di virulenza.

Le 7 proteine strutturali sono invece codificate dagli ORFs 2-7 ed espresse da 6 mRNA subgenomici.

Esse includono 3 proteine minori N-glicosilate (GP2a, GP3 e GP4), una proteina minore non-glicosilata 2b e la glicoproteina maggiore dell'envelope GP5, codificate da ORF 2b, le quali formano un eterodimero con la proteina non-glicosilata M. Questo eterodimero è un requisito fondamentale per l'infettività degli *Arterivirus*. 2b è anche essenziale per la sua funzione di canale ionico per facilitare la rimozione dell'envelope durante l'infezione.

Le 3 proteine strutturali principali N, M e GP5 sono indispensabili per la formazione della particella e per l'infettività del PRRSV.

Un'ulteriore proteina strutturale N, o proteina del nucleocapside, è codificata da ORF7 ed essendo altamente immunogenica è utilizzata come proteina diagnostica nella ricerca di anticorpi contro PRRSV. Questa proteina, nelle cellule ospiti, si trova sia nel citoplasma (per la formazione delle particelle virali) che nel nucleo dove ha un importante compito nell'antagonizzare il funzionamento del genoma cellulare (Veit et al., 2014; Kappes, M.A., Faaberg, K.S., 2015).

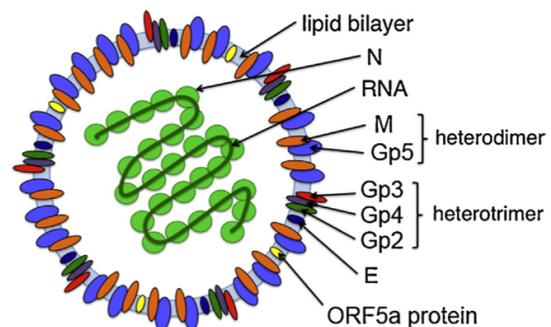


Fig.2 Schema di una particella di *Arterivirus* (Veit et al. 2014).

## 2.2 ETEROGENEITÀ

Gli stipiti di PRRSV vengono distinti in due genotipi, Europeo (Tipo 1) e Nord-Americano (Tipo 2), entrambi però diffusi globalmente.

Anche stipiti all'interno dello stesso genotipo variano considerevolmente con differenze nella sequenza che raggiungono picchi fino al 20%. Il tipo 1 è stato diviso in almeno altri 3 sottotipi basandosi sulla lunghezza di ORF7 dove il protogenotipo 1, il Lelystad virus, fa parte del sottotipo 1 (Forsberg et al., 2002; Stadejek et al., 2002, 2006, 2008).

I sottotipi appartenenti al genotipo Tipo 1 mostrano anche differenze in termini di lunghezza della proteina del nucleocapside di dimensioni variabili, comprese tra i 124-132 amminoacidi, a seconda del sottotipo. Sorprendentemente tale variabilità colpisce anche la porzione C-terminale, solitamente contraddistinta da forti vincoli strutturali. Tale divergenza all'interno dei sottotipi di PRRSV causa un alto tasso di risultati falsamente negativi di RT-PCR utilizzata a fini diagnostici (Toplak, 2012; Drigo et al., 2014) e può anche ridurre l'affidabilità dei test sierologici che utilizzano come antigene la proteina del nucleocapside.

Gli stipiti americani, che derivano dal genotipo NA (Tipo 2), si sono evoluti velocemente grazie a fenomeni di ricombinazione e drift genetico dando origine a nuovi stipiti più virulenti e difficili da controllare con i vaccini disponibili (PRRSV atipico o SAMS – Sow Abortion and Mortality Syndrome).

Il genotipo Tipo 2 di PRRSV in Europa è sempre apparso geneticamente omogeneo data la sua probabile prima introduzione avvenuta tramite l'utilizzo di vaccini vivi attenuati. Sono però ormai evidenti successive introduzioni indipendenti di stipiti di campo virulenti (Shi et al., 2010). È il caso dei due stipiti di PRRSV genotipo Tipo 2 circolanti in Slovacchia ed Ungheria che appartengono al cluster genetico MN184 derivante dal Nord America (Shi et al., 2010; Stadejek et al., 2013).

La proteina strutturale più variabile è GP5 con il 50-55% di omologia tra isolati Nord-Americani ed Europei. Le sequenze più conservate sono invece ORF5 e ORF7 (Pesente et al., 2006; Shi et al., 2013).

La variabilità delle sequenze non può essere interamente imputata all'origine geografica poiché è possibile trovare campioni con sequenze non correlate ad altri isolati della stessa area geografica (Prieto et al., 2009; Kvisgaard et al., 2013); inoltre è stata osservata la mancanza di correlazione tra il grado di omogeneità e l'origine geografica dei ceppi di PRRSV europei (Pesch et al., 2005). Prieto et al. suggerirono un aumento della divergenza tra ceppi vecchi e più recenti di circa lo 0,5% annuo, ma l'analisi dell'albero filogenetico indicò che l'eterogeneità osservata non sembrava essere dovuta esclusivamente ad un'evoluzione tem-

porale. Gli isolati infatti, analizzati nel loro complesso, formavano dei cluster indipendentemente dal momento di isolamento indicando perciò una co-circolazione di diversi ceppi.

La variabilità del PRRSV osservata in campo può essere quindi la conseguenza di 4 diversi fenomeni (Prieto, 2009):

- I. Co-circolazione di diverse varianti di PRRSV che possono essersi evolute in maniera indipendente.
- II. Introduzione di nuove varianti nella popolazione suina.
- III. Scoperta di varianti precedentemente sconosciute.
- IV. Ritorno della virulenza in ceppi di virus vaccinali ora in grado di trasmettersi tra diversi gruppi di suini.

Oltre a questi fattori la ricombinazione dell'RNA è uno strumento estremamente potente ed efficace per l'evoluzione di un virus ad RNA.

### **2.3 MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELL'EVOLUZIONE DI PRRSV**

Come nel caso di altri virus ad RNA la replicazione del PRRSV è un processo altamente prone a dare errori a causa della mancanza di capacità di "proof-reading" della polimerasi virale.

Nonostante non vi siano stime empiriche del tasso di mutazione del PRRSV, è comunemente accettato che i virus ad RNA abbiano il più alto tasso di mutazioni rispetto ad ogni altro organismo, circa una mutazione per replicazione (Drake, 1993; Duffy et al., 2008; Sanjuàn et al., 2010).

In secondo luogo le cinetiche di replicazione causano la produzione di migliaia di particelle virali entro poche ore da un singolo evento infettivo di successo. Questo vuol dire che al picco d'infezione nell'ospite sono presenti svariati milioni di particelle virali. Una popolazione così ampia aumenta l'efficacia della selezione naturale in cui mutanti con una fitness migliore prendono il posto dei loro competitors con alleli "inferiori".

In più esistono enzimi cellulari dell'ospite che aumentano il tasso di mutazione virale in parte come meccanismo antivirale innato, tentando di spingere i virus ad RNA il threshold di errori tollerabili in modo tale che l'accumulo di mutazioni deleterie riduca la fitness o inibisca la replicazione. Un esempio è la proteina suina APOBEC3 che deamina i residui di citosina ad uracile (Larue et al., 2008).

Un altro meccanismo che spiega la variabilità del PRRSV è la ricombinazione, un'attività integrale nel ciclo di vita del virus che permette la generazione di mRNA subgenomici tramite la sintesi discontinua di RNA. Il processo ricalca il modello di ricombinazione "copy-choice" (Lai, 1992), mediato da sequenze regolatorie del PRRSV, in cui la RNA polimerasi RNA dipendente

scambia il materiale dell'ospite con quello del donatore mentre rimane attaccata alla sequenza neo-formata.

Da un punto di vista evolutivo, in caso di co-infezione con più di uno stipite, la ricombinazione può accelerare il ritmo in cui combinazioni di mutazioni vantaggiose vengono ottenute o mutazioni deleterie vengono rimosse. In vitro è stato dimostrato come la ricombinazione avvenga in virus con genotipo di tipo 1 o di tipo 2 (Van Vugt et al., 2001), ma non tra di loro (Murtaugh et al., 2002). La ricombinazione è stata dimostrata anche in vivo (Liu et al., 2011) anche se i ricombinanti avevano una fitness minore e non sopravvivevano a più di qualche passaggio rispetto ai loro ceppi parentali (Murtaugh et al., 2002).

Nonostante in media i ricombinanti abbiano una fitness minore, un'analisi bioinformatica ha rivelato come giochino un ruolo fondamentale nel definire la diversità globale del PRRSV (Forsberg et al., 2002; Shi et al., 2013; Franzo et al., 2014). Ancora non si sa che impatto abbia avuto la ricombinazione nell'evoluzione fenotipica in relazione a virulenza, preferenza di ospite o capacità di evitare una risposta immunitaria, grazie all'introduzione di mutazioni genetiche su larga scala ha accelerato enormemente l'evoluzione in confronto ad una "single point mutation".

## **LA PATOGENESI**

L'insorgenza della malattia è il prodotto di 4 componenti distinte: la patogenicità del virus (non ancora ben compresa fino ad oggi), la razza (suscettibilità: Hampshire > Large White > Duroc > Landrace) (Lewis et al., 2007), il fenotipo (linee magre vs non magre) e le condizioni ambientali.

Tutti e quattro questi fattori possono influenzare notevolmente l'insorgenza della malattia e/o la prevalenza a livello aziendale comportando una grande variabilità della forma clinica, da inapparente a letale, con ampie fluttuazioni della morbilità e letalità e delle perdite economiche dirette e indirette (Zimmerman et al., 2006).

La malattia può essere talvolta estremamente grave come nelle epidemie caratterizzate da "febbre alta" sostenute dagli stipiti cinesi o da alcuni provenienti dalla Bielorussia (Karniychuk et al., 2010). In questi casi è molto probabile che la sinergia tra PRRSV e LPS batterici giochi un ruolo cruciale amplificando la risposta infiammatoria dei macrofagi infetti (Qiao et al., 2011). Ad oggi si possono considerare fondamentalmente due fasi nell'infezione di PRRSV:

- I. *Fase acuta*: include le prime 2 settimane dall'infezione durante le quali si possono riscontrare i più alti titoli virali negli organi suscettibili;
- II. *Fase persistente*: caratterizzata da minori livelli di replicazione virale localizzata solo in alcuni organi.

## **2.3 FASE ACUTA DELL'INFEZIONE**

L'infezione da PRRSV avviene più frequentemente nelle vie respiratorie. Dopo l'esposizione il virus replica in prima istanza nei macrofagi suscettibili del tratto respiratorio, poiché sono portatori del recettore della sialoadesina, e rapidamente diffonde agli organi linfoidi e ad altri tessuti (Van Reeth, 1997; Zimmerman et al., 2006) come il cuore e il cervello, sia in forma libera nel flusso sanguigno sia grazie a leucociti e monociti (Prieto e Castro, 2000). Li et al. riportano che un isolato altamente patogenetico di PRRSV, JXwn06, potrebbe possedere un tropismo più ampio tale da includere anche le cellule epiteliali tra i suoi target.

Tra le cellule che sappiamo supportare la replicazione virale contiamo i macrofagi alveolari polmonari (PAM), i macrofagi intravascolari polmonari (PIM) e i macrofagi nel tessuto linfoide (Zimmerman et al., 2006).

Da ricerche recenti si è scoperto però che alcuni stipiti di PRRSV appartenenti al sottotipo 3 (prototipo Lena) emersi in Europa Orientale differiscono immunopatologicamente rispetto a quelli simil-Lelystad perché in grado di infettare una nuova sottopopolazione di macrofagi tissutali che non possiedono il recettore per la sialoadesina. L'aspetto più preoccupante di questa nuova scoperta è dovuto alla concentrazione maggiore di questa popolazione di macrofagi che permette di conseguenza una replicazione virale più intensa (Karniychuk et al., 2010).

Ad ogni modo stipiti virulenti di PRRSV possono causare viremia in 12 ore, in media entro le 24 ore post-inoculazione. I titoli virali crescono velocemente e hanno un picco nel siero, nei linfonodi e nel polmone tra il giorno 7 e 14. La concentrazione di virus maggiore si ha nel polmone (Zimmerman et al., 2006).

Dopo il picco i titoli virali decrescono rapidamente nel siero. La maggior parte dei suini non è più viremica al 28 giorno post-infezione (DPI) nonostante l'RNA virale sia stato trovato nel siero tramite RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) fino a 251 DPI (Wills et al., 2003).

### **2.3.1 PATOGENESI IN SCROFE IN GESTAZIONE**

Nelle scrofette e nelle scrofe il periodo di incubazione varia notevolmente anche se i primi segni clinici appaiono di solito attorno a 2-7 DPI.

Il virus replica secondo il pathway già descritto oltrepassando la placenta solo dopo i 70 giorni di gestazione, ciò avviene per due ragioni: il recettore per la sialoadesina non è presente sui macrofagi placentari nell'allantocorion e per la presenza di difese efficaci contro le cellule infettate da PRRSV.

L'importanza dell'infezione nelle prime fasi fino a metà gestazione è relativamente bassa e la trasmissione venerea del PRRSV può avere un effetto insignificante o addirittura nessun effetto sul concepimento e il tasso di fertilizzazione se si considera una sola scrofa (Prieto and Castro, 2000; Cheon and Chae, 2001). Al contrario la possibilità di infezione transplacentare e i suoi effetti negativi aumentano al progredire della gestazione.

Un'infezione durante l'ultimo terzo di gravidanza provoca lesioni alla placenta e al cordone ombelicale causando ipossia fetale e di conseguenza un gran numero di aborti e suinetti nati deboli. Vi è la possibilità che nascano suinetti persistentemente infetti in seguito ad infezioni intrauterine in tarda gravidanza. Questi animali si presenteranno viremici alla nascita e più suscettibili a patogeni secondari e a sviluppare sofferenza respiratoria (Prieto and Castro, 2000).

### **2.3.2 I VERRI**

I verri sono molti importanti nella trasmissione del PRRSV con il seme, visto il grande utilizzo che se ne fa nell'allevamento intensivo.

E' stato dimostrato, sia sperimentalmente che in campo, che:

- I. La presenza del virus nel seme è stata datata fino a 92 giorni post-inoculazione (Christopher-Hennings, 2000).
- II. L'infezione del testicolo ha come target 2 specie cellulari: le cellule epiteliali germinali dei tubuli seminiferi e i macrofagi localizzati nell'interstizio del testicolo (Sur et al., 1997).
- III. Verri vasectomizzati possono comunque eliminare PRRSV con il seme fino alla fine della viremia suggerendo che il virus potrebbe arrivare nel seme attraverso distribuzione sistemica e non esclusivamente tramite la replicazione nel testicolo e nell'epididimo.

L'infezione del testicolo porta alla formazione di cellule giganti multinucleate con abbondante perdita di cellule germinali e morte per apoptosi. Contemporaneamente vi è un significativo aumento del numero di cellule seminali immature infettate con PRRSV responsabili della trasmissione venerea del virus.

### **2.4 FASE PERSISTENTE DELL'INFEZIONE**

Come descritto precedentemente, PRRSV causa un'infezione acuta prolungata la cui viremia può durare dalle 4 alle 5 settimane. Tale fase è seguita da un'infezione persistente del tessuto linfoide che può durare fino a 157 DPI in suinetti svezzati (Wills et al., 1997).

I suinetti nati vivi da scrofe infettate in tarda gestazione tendono ad essere viremici per periodi più lunghi, anche 11 settimane dalla nascita (Suarez, 2000).

Uno studio condotto da Bierk et al. (2001) ha dimostrato che PRRSV può persistere in scrofe non gravide fino a 86 DPI e che le scrofe persistentemente infette possono trasmettere PRRSV per lunghi periodi di tempo. Ad ogni modo è stato dimostrato che l'eliminazione del virus da animali infettati sperimentalmente non è stata rilevata tra 90 e 180 DPI (Batista et al., 2002), anche se lo stress e l'immunodepressione possono indurre un ritorno all'escrezione del virus (Van Reeth, 1997).

## 2.5 INFEZIONI SECONDARIE DA ALTRI PATOGENI

Studi sperimentali hanno rilevato che suini co-infettati con PRRSV e *Streptococcus suis* (*S. suis*) presentano un aumento dell'incidenza di setticemia, meningiti, mortalità (Galina et al., 1994; Thanawongnuwech et al., 2000) e un aumento delle infezioni polmonari da *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) (Brockmeier et al., 2000).

Inoltre si è scoperto che infezioni primarie da PRRSV e *B. bronchiseptica* predispongono gli animali ad infezioni polmonari secondarie con *P. multocida* (Brockmeier et al., 2000) e che un'infezione concomitante di PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) potenzia e prolunga la durata clinica della polmonite indotta da PRRSV a livello macroscopico e microscopico (Thacker et al., 2000). Duplici infezioni di PRRSV con PRCV o H1N1-SIV causano, rispetto ai singoli patogeni, una malattia molto più severa clinicamente associata a ritardi della crescita. (Van Reeth et al., 1996)

Per descrivere situazioni cliniche analoghe a questa si utilizza il termine "*porcine respiratory disease complex*" che definisce una polmonite ad eziologia multipla che causa una sintomatologia clinica e l'incapacità di guadagnare peso nella fase di finissaggio.

Quando un'infezione da patogeni primari del tratto respiratorio, proprio come nel caso del PRRSV, viene complicata da batteri opportunisti avremo una presentazione clinica molto più grave e perdite economiche maggiori.

Patogeni primari del tratto respiratorio sono:

- I. Virus: PRRSV, SIV, pseudorabies virus (PRV), PCV2 e PRCV
- II. Batteri: *M. hyopneumoniae*, *B. bronchiseptica* e App.

Patogeni opportunisti sono invece *P. multocida*, *H. parasuis*, *S. suis*, *Actinobacillus suis* e *Arcanobacter pyogenes*.

Cause non infettive come il management degli animali e i fattori ambientali, come ventilazione e riscaldamento dei locali, possono favorire la trasmissione dei patogeni e creano condizioni non favorevoli all'animale causando stress o danno delle vie respiratorie.

## 3. Immunologia

La risposta immunitaria nelle infezioni da PRRSV è stata definita da Molitor et al. nel 1997 come una spada a doppio taglio.

Da un lato PRRSV predilige le cellule immunitarie durante l'infezione e le manifestazioni cliniche sono direttamente collegate a modificazioni del sistema immunitario come nel caso dell'immunosoppressione che a sua volta predispone l'animale a infezioni secondarie.

Dall'altro lato il virus stimola l'immunità nel post-infezione proteggendo l'animale da re-infezioni.

Da ciò si evince che il sistema immunitario è intimamente coinvolto sia nella malattia che nei meccanismi che la prevengono.

### 3.1 IMMUNOSOPPRESSIONE

La modulazione del sistema immunitario PRRSV-dipendente è suggerita dall'evidenza che infezioni secondarie seguano comunemente infezioni da PRRSV e quando ciò avviene la situazione clinica degli animali infettati sperimentalmente precipita.

Il virus agisce da immunomodulatore in 4 modi principali:

- I. interferendo con la presentazione dell'antigene;
- II. inducendo l'apoptosi delle cellule coinvolte nella risposta immunitaria;
- III. agendo come citochine o inibitori delle citochine influenzando la loro produzione e azione;
- IV. inibendo il complemento.

In particolare gli effetti dell'infezione da PRRSV si vedono direttamente sui macrofagi. Tali effetti, dovuti alla replicazione virale, causano un'inibizione della capacità di fagocitosi e culminano nella morte della cellula che avviene generalmente 24 ore dopo l'infezione (Drew, 2000; Sun et al., 2012).

### 3.2 IMMUNITÀ UMORALE

Gli anticorpi circolanti contro PRRSV possono essere trovati a partire da 14 DPI (in alcuni animali anche a partire da 5-7 DPI). La risposta delle IgM raggiunge il picco a 14-21 DPI e decresce rapidamente diventando irrilevabile verso i 35-42 DPI.

I titoli di IgG sono rilevabili fino ai 7-19 DPI con il loro picco a 21-28 DPI, rimangono costanti per circa un mese e si abbassano di livello entro i 300 DPI (Drew, 2000; Zimmerman et al., 2006; Mateu et al., 2008).

Gli anticorpi diretti contro la proteina N sono i più abbondanti e perciò più facilmente ricercabili. La risposta anticorpale diretta contro le proteine M ed E è minore (Drew, 2000).

La rapida crescita dei titoli di IgM e IgG non è correlata alla protezione della malattia, poiché essi non sono equivalenti agli anticorpi neutralizzanti.

Gli anticorpi neutralizzanti (NAs) appaiono nel siero dopo 3 settimane PI, ma vengono rilevati solo dopo 28 DPI; ad ogni modo la risposta degli NAs varia individualmente. Essi sono prevalentemente diretti contro la proteina E che contiene la maggior parte degli epitopi neutralizzanti. Anche GP4 e M contengono epitopi neutralizzanti ma il loro significato biologico è minore.

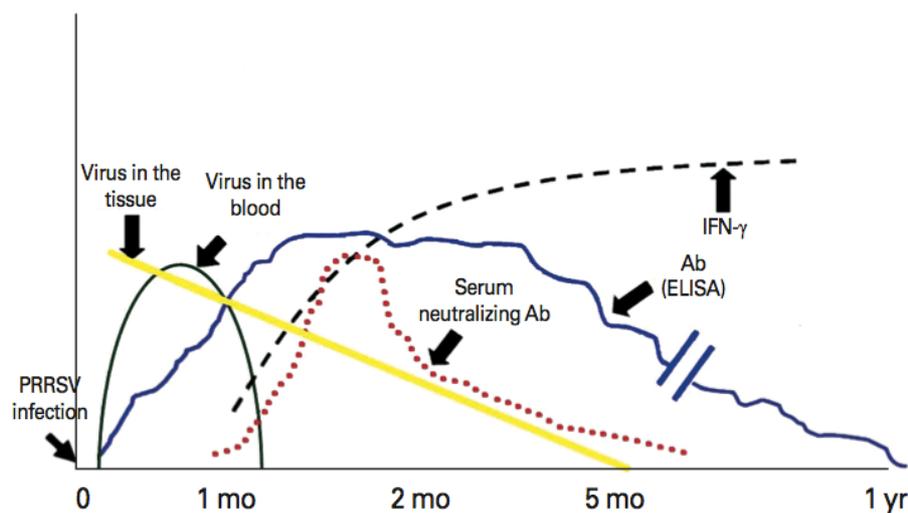


Fig. 3 Risposta immunitaria umorale (Lopez et al., 2004)

Il ruolo degli NAs, sia per la loro comparsa tardiva che per la variabilità dei titoli, sembra essere secondario nella risposta immunitaria contro PRRSV, pur avendo un ruolo molto importante nel prevenire la re-infezione.

E' stato osservato che un trasferimento di NAs a scrofe gravide ha un effetto protettivo contro il fallimento riproduttivo, perciò un vaccino capace di indurre i NAs potrebbe prevenire la malattia clinica ed essere uno strumento assai utile nell'eradicazione del PRRSV (Mateu, Diaz, 2008).

### 3.3 IMMUNITÀ CELLULOMEDIATA

La complessità della regolazione della risposta immunitaria nei confronti di PRRSV è indicata chiaramente dal graduale declino dell'immunità umorale concomitante all'aumento dell'immunità cellulomediata (Meier et al., 2000).

La proliferazione di linfociti antigene-specifici è rilevata inizialmente a 4 settimane PI, il picco si presenta a 7 settimane e declina verso le 11 settimane PI. La decrescita del tempo richiesto perché l'organismo sviluppi una risposta immunitaria efficiente nel caso di una re-infezione è il risultato della proliferazione dei linfociti T. Essi inizialmente contribuiscono poco all'immunità nei confronti di PRRSV ma crescono costantemente per 1-2 anni PI (Zimmerman et al., 2006). La risposta delle citochine è portata avanti fundamentalmente dall'interferone (IFN)-gamma e in misura minore dall'interleuchina (IL)-2.

L'immunità cellulomediata è altamente variabile, da bassa a molto alta, e inconsistente temporalmente. Le differenze nella risposta possono essere dovute allo stipite virale e/o al metodo diagnostico utilizzato per rilevarla.

Le caratteristiche inusuali della risposta immunitaria al PRRSV suggeriscono che il virus moduli fortemente la risposta immunitaria alterando i pattern delle citochine dei macrofagi, inibendo citochine chiave, come l'IFN-alfa, ed infine riducendo l'espressione di molecole coinvolte con la presentazione dell'antigene (Mateu, Diaz, 2008).

### **3.4 CROSS PROTEZIONE**

Considerando la diversità genetica dei vari stipiti di PRRSV all'interno di uno dei due tipi di virus la cross protezione contro isolati eterologhi è una delle questioni chiave nelle strategie di prevenzione della malattia, come ad esempio quelle vaccinali.

Per tale motivo vari autori hanno quindi investigato se la diversità genetica tra gli stipiti possa influenzare l'efficacia di vaccini omologhi o eterologhi.

I primi studi dimostrarono un alto livello di protezione con stipiti omologhi a quelli immunizzanti e che i vaccini vivi attenuati erano i migliori.

In seguito però apparì chiaro che i vaccini basati su un singolo stipite di PRRSV erano solamente parzialmente efficaci contro l'infezione da stipiti di campo (Kimman et al., 2009).

Tuttavia la determinazione del livello di protezione nei confronti dell'infezione da uno stipite di PRRSV diverso da quello usato come vaccino è molto più complicata rispetto ad una mera differenza genetica, addirittura il grado di omologia genetica tra vaccino e isolato non è un buon metodo per conoscere l'efficacia del vaccino (Prieto et al., 2008).

Martelli et al. nel 2009 hanno concluso che l'efficacia di un vaccino non è solamente legata alle sue proprietà immunologiche ma anche alla sua capacità di stimolare una risposta immunitaria.

Concludendo è quindi opinione comune che l'abilità di un vaccino di indurre una risposta immunitaria cellulomediata è più importante rispetto al grado di omologia tra il vaccino e lo stipite di campo.

### **3.5 IMMUNITÀ MATERNA**

Non vi sono studi specifici che valutano l'influenza dell'immunità materna sulla suscettibilità dei suinetti al PRRSV, tuttavia esistono degli studi indiretti che suggeriscono che scrofe immunizzate garantiscano protezione materna ai suinetti.

Anticorpi anti-PRRSV sono presenti nel colostro alla stessa concentrazione che nel sangue e le infezioni da PRRSV aumentano al diminuire degli anticorpi materni (Zimmerman et al., 2006).

## 4. Diagnosi

La diagnosi di PRRSV si può basare su (Zimmerman et al., 2006):

- I. Informazioni soggettive: storia, segni clinici, lesioni macro e microscopiche;
- II. Informazioni oggettive: storia produttiva, ritrovamento del virus, sierologia.

Una diagnosi presunta di PRRS è suggerita in ogni allevamento con problemi riproduttivi nelle scrofe e problemi respiratori in animali di tutte le età.

I registri di produzione in gruppi di animali PRRS positivi mostrano un aumento degli aborti, dei parti prematuri, dei nati morti, della mortalità pre-svezzamento ed infine una diminuzione moderata del tasso di crescita e dell'indice di conversione alimentare (Mengeling and Lager, 2000). E' difficile fare una diagnosi basandosi solo sui segni clinici sia perché essi sono variabili tra i vari allevamenti sia perché non esistono segni macroscopici patognomonic.

Per questo motivo le diagnosi differenziali devono includere molti altri patogeni come Parvovirus, PRV, PCV2, Enterovirus, SIV, Cytomegalovirus e Leptosirosi (Zimmerman et al., 2006).

Un uso e un'interpretazione adeguata dei test diagnostici disponibili per PRRSV possono quindi fornirci molte informazioni utili ai fini diagnostici. Tra i vari metodi sviluppati per la diagnosi di PRRS vi sono l'isolamento del virus, il ritrovamento degli anticorpi, degli antigeni o degli acidi nucleici nei tessuti infetti o nei fluidi corporei (Martinez et al., 2008).

### 4.1 SIEROLOGIA

La dimostrazione della sierconversione o dell'aumento dei titoli di anticorpi specifici contro PRRSV è il metodo d'elezione per fare diagnosi in una popolazione. Bisogna però ricordare come non abbia nessuna utilità in gruppi di animali precedentemente infettati o vaccinati poiché la sierologia non riesce a differenziare queste 3 categorie di animali.

Proprio per questo motivo in caso di un monitoraggio di un gruppo di animali tale tecnica diagnostica dovrebbe essere utilizzata in combinazione con un metodo per la ricerca dell'acido nucleico.

Il gold standard per la ricerca di anticorpi anti PRRSV è il test ELISA commerciale che ha come target gli anticorpi contro gli antigeni del nucleocapside (sia per i ceppi europei che nord americani).

Bisogna ricordare che gli anticorpi che utilizziamo per la diagnosi non sono anticorpi neutralizzanti e che il ritrovamento nei suinetti può essere dovuta alla presenza di immunità materna. L'utilizzo di tecniche di rilevamento per IgG e IgM è una scelta tattica dovuta alla loro comparsa prematura rispetto agli NAs (Fig. 3 pagina 16).

## 4.2 RICERCA DI PRRSV

La presenza di PRRSV può essere dimostrata con (Bøtner, 1997):

- I. isolamento del virus utilizzando colture cellulari;
- II. rilevamento diretto degli antigeni virali in sezioni di tessuto;
- III. ritrovamento di RNA specifico del virus.

I campioni per l'isolamento dell'RNA virale devono essere refrigerati a 4 °C immediatamente dopo il prelievo poiché il congelamento potrebbe degradare l'RNA virale. Bisogna inoltre prestare attenzione anche alla sterilità, oltre che alla temperatura, poiché la contaminazione batterica potrebbe alterare il pH e quindi degradare il materiale campionato (Zimmerman et al., 2006).

L'isolamento del virus è possibile sia utilizzando macrofagi alveolari suini (PAMs) sia linee cellulari del rene di scimmia africana nonostante il primo sia il più sensibile. Il tempo richiesto da questo test varia da 1 giorno a varie settimane in relazione alla quantità di virus campionato.

La presenza degli antigeni virali può invece essere fatta grazie all'immunoistochimica (IHC) e l'immunofluorescenza (IF). L'IHC è più sensibile rispetto all'IF che però ha il vantaggio di essere economica e rapida.

L'isolamento dell'acido nucleico virale e il suo sequenziamento con tecnica RT-PCR verranno meglio discussi nel capitolo Materiali e Metodi essendo la tecnica chiave che ci permette di effettuare la ricerca di epidemiologia molecolare su cui questa tesi poggia le fondamenta.

## 5. Epidemiologia

L'epidemiologia del PRRSV è stata definita da Blaha nel 2000 come *"colorful"* (colorita) perché, a differenza di molte malattie che presentano caratteristiche endemiche o epidemiche, PRRSV ha alcune caratteristiche prettamente epidemiche, altre chiaramente endemiche e alcune miste. Ad esempio la malattia riproduttiva sembra avere le caratteristiche di un'infezione epidemica, la malattia respiratoria invece è più vicina ad un'infezione endemica con una risposta immunitaria debole e sintomi clinici la cui severità è molto variabile.

### 5.1 VIE DIRETTE DI TRASMISSIONE

La trasmissione diretta di PRRSV avviene grazie alla vicinanza tra portatore e suini suscettibili, soprattutto per contatti diretti naso-naso o per contatto con urine e feci (Albina, 1997).

Gli animali infetti eliminano il virus con la saliva fino a 42 DPI, con le secrezioni nasali fino a 38 DPI, con le urine fino a 28 DPI e con le feci fino a 35 DPI (Prieto et al., 2005). Inoltre scrofe infettate in tarda gestazione eliminano virus con le secrezioni mammarie (Zimmerman et al., 2006).

PRRSV è stato ritrovato nel seme fino a 43 DPI e nelle ghiandole bulbouretrali fino a 101 DPI mentre l'RNA virale nel seme è presente fino a 92 DPI (Cho and Dee, 2006; Zimmerman et al., 2006). Ovviamente la persistenza nel seme è influenzata da fattori individuali, dallo stipite di PRRSV e dal metodo diagnostico utilizzato (Prieto et al., 2005).

I suini sono suscettibili al PRRSV tramite diverse vie di infezione come quella intranasale, intramuscolare, orale, intrauterina e vaginale.

La probabilità che una data dose di virus causi infezione in un animale dipende dalla via di trasmissione: i suini sono particolarmente sensibili all'esposizione per via parenterale, in minor misura per le vie orale e intranasale. In allevamento una possibile via parenterale è rappresentata dalle pratiche di management degli animali in sala parto come il taglio della coda, l'inoculazioni di vaccini e l'applicazione del tattoo di riconoscimento.

Anche comportamenti aggressivi dei maiali tra di loro, come il morso della coda e delle orecchie, possono rappresentare una via di esposizione parenterale essendo il virus eliminato con la saliva (Zimmerman et al., 2006).

Come descritto precedentemente PRRSV può essere trasmesso per via transplacentare da scrofe viremiche ai feti causando morte fetale o nascita di suinetti infetti.

## **5.2 VIE INDIRECTE DI TRASMISSIONE**

La trasmissione indiretta avviene tramite oggetti inanimati (strumentazione, equipaggiamento, vestiti), vettori viventi o aerosol.

Sono stati identificati come possibili fonti in infezione: stivali e copristivali, veicoli di trasporto, gli strumenti o locali entrati in contatto diretto con gli animali durante l'allevamento e le zanzare. In quest'ultime il virus si localizza nel tratto intestinale ma, non essendo vettori biologici, la permanenza di PRRSV al loro interno dipende dalla quantità di virus ingerito e dalla temperatura ambientale.

Altri mammiferi e uccelli sono stati testati per verificare la loro suscettibilità al virus e nessuno si è dimostrato in grado di essere un vettore meccanico o biologico (Cho e Dee, 2006).

La trasmissione aerea ha un ruolo molto importante nell'epidemiologia di PRRSV poiché è stato dimostrato che il patogeno può essere propagato fino a 4,7 Km di distanza (Dee et al., 2009; Otake et al.; 2012). Studi recenti hanno reso evidente che l'introduzione di sistemi di filtraggio per l'aria riduce il rischio d'infezione di circa l'80% anche in allevamenti isolati (Dee et al., 2012; Alonso et al., 2013).

E' evidente come le vie di trasmissione indiretta siano varie e subdole e per tale motivo negli ultimi anni sono stati implementati tutti quegli accorgimenti tecnici atti a interrompere tali vie di trasmissione. Tali misure, dette di biosicurezza, possono includere per esempio l'applicazione di zanzariere, la restrizione degli ingressi di veicoli e personale negli allevamenti, le docce e lavaggi dedicati al personale e ai mezzi di rifornimento.

## **5.3 INFEZIONE PERSISTENTE IN ANIMALI IN RIPRODUZIONE**

La persistenza in questa sottopopolazione può essere il risultato di diversi meccanismi. La catena di infezioni viene mantenuta da un ciclo di trasmissione tra scrofe e suinetti, sia in utero che post-parto o mischiando animali suscettibili con animali infetti. Infatti, anche dopo un'epidemia di PRRSV alcuni animali rimangono suscettibili e di conseguenza possono essere infettati in ogni momento.

Altri suini suscettibili possono essere aggiunti alla popolazione come rimonta, nascendo da madri sieronegative o perdendo l'immunità passiva o attiva (Nodelijk et al., 2003).

Perciò in ogni momento in cui si mischiano suini infetti e suscettibili una larga percentuale della popolazione può rapidamente diventare infetta (Zimmerman et al., 2006).

## 6. Segni clinici e Lesioni

### SEGNII CLINICI

I segni clinici principali sono in gran parte dovuti alla viremia acuta e alla trasmissione transplacentare che esita in un fallimento della gestazione.

Le epidemie cliniche si presentano quando il virus entra in una popolazione ancora immunologicamente scoperta, interessando gli animali di tutte le età.

PRRS endemica avviene invece in popolazioni che possiedono un'immunità omologa nei confronti dello stipite infettante. I segni clinici in questo caso sono osservati solo in sottopopolazioni suscettibili (Zimmerman et al., 2006).

#### 6.1 EPIDEMIA DI PRRSV

La prima fase di un'epidemia di PRRSV dura all'incirca 2 settimane o poco più ed è caratterizzata da anoressia e letargia, dovuti alla viremia acuta, in animali di tutte le età. Gli animali interessati possono anche essere linfopenici, piretici (temperature rettali dai 39-41 °C), tachipnoici o dispnoici e possono presentare iperemia o cianosi cutanea transitoria delle estremità corporee.

La seconda fase può cominciare prima che quella iniziale termini e continua per 1-4 mesi. Questa è caratterizzata da un alto tasso di fallimento riproduttivo e un'alta mortalità pre-svezzamento.

**Scrofe:** nella fase acuta aumenta il numero di aborti (circa il 2-3%) ed è possibile osservare ritorni in estro e scrofe non gravide. La mortalità nelle scrofe durante il periodo acuto è di circa l'1-4% ed è talvolta associata a edema polmonare e cistite/nefrite.

In casi di PRRS con fase acuta molto severa sono stati osservati un tasso di aborti del 10-50% e un tasso di mortalità fino al 10%.

Il fallimento riproduttivo include bassi tassi di concepimento e di parti.

**Verri:** oltre all'anoressia, letargia e segni respiratori i verri possono presentare una diminuzione della libido e una riduzione variabile della qualità del seme (alterazioni della motilità e difetti acrosomiali). Tali sintomi si possono presentare tra le 2 e le 10 settimane PI (Prieto et al., 2005; Zimmerman et al., 2006).

**Suinetti pre-svezzamento:** si osserva una alta mortalità sia in suini nati prematuramente che a termine. Spesso tale moria è associata a diarrea, emaciazione, *splay-leg*, tachipnea e dispnea. Meno comuni sono invece tremori, anemia e poliartriti e meningiti batteriche (Zimmerman et al., 2006).

**Suinetti svezzati e in fase di finissaggio:** infezioni acute da PRRSV sono caratterizzate da anoressia, letargia, iperemia cutanea, tachipnea e dispnea senza tosse. Sono inoltre riportati aumento dell'incidenza di malattie endemiche e un'aumento della mortalità (Zimmerman et al., 2006).

## **6.2 PRRSV ENDEMICO**

PRRSV, una volta introdotto in un allevamento, tende a diventare endemico portando ad una regolare o occasionale epidemia di PRRS acuta nelle sottopopolazioni suscettibili come gli animali in sala parto, i suinetti in crescita e le rimonte di scrofette e verri (Stevenson et al., 1993; Zimmerman et al., 2006).

Nelle sale parto la mortalità aumenta in particolar modo nei mesi invernali suggerendoci, come già detto in precedenza, che fattori ambientali come la diminuzione della temperatura ambientale, l'aumento dell'escursione termica, la diminuzione della ventilazione e l'aumento dell'umidità relativa giocano un ruolo fondamentale nella circolazione del virus e nella risposta immunitaria (Stevenson et al., 1993).

Le conseguenze riproduttive negli animali dipendono da molti fattori come il numero di animali infetti e dal periodo di gestazione in cui si trovava la scrofa quando infettata.

Se la percentuale di animali infetti è bassa potremmo avere qualche aborto sporadico, un irregolare ritorno in estro, scrofette non gravide e fallimento riproduttivo in tarda gestazione (Zimmerman et al., 2006).

## **LESIONI**

Le lesioni da PRRSV più caratteristiche sono osservate in giovani suini particolarmente interessati dalla sindrome respiratoria causata dal virus. Le lesioni macroscopiche e microscopiche sono osservate con più frequenza tra i 4 e 28 DPI, cioè al picco di replicazione, in polmone e linfonodi.

La distribuzione e la gravità delle lesioni dipendono dalla virulenza dello stivite di PRRSV. Le lesioni macroscopiche non sono mai patognomoniche di PRRSV poiché un gran numero di altri patogeni batterici e virali possono causare lesioni simili. Le lesioni microscopiche sono invece più significative e quindi ci permettono di presupporre una infezione da PRRSV. Ad ogni modo una diagnosi definitiva si può fare solo dimostrando la presenza del virus (Mengeling et al., 2000; Zimmerman et al., 2006).

### 6.3 LESIONI MACROSCOPICHE

**Polmoni:** polmonite interstiziale è stata osservata dai 3 ai 28 DPI con l'acme tra i 10-14 DPI. In caso di lesioni leggere vi è un interessamento craniale o diffuso dei polmoni, il parenchima afflitto è elastico, leggermente duro, grigio e umido.

In caso di lesioni gravi esse sono diffuse a tutto il parenchima che si presenta a macchie o diffusamente rosso, duro, gommoso e molto umido (Zimmerman et al., 2006). In assenza di complicazioni le lesioni si risolvono in circa 4 settimane dall'esposizione (Mengeling et al., 2000).

**Linfonodi:** le lesioni si presentano generalmente di colore grigio e i linfonodi sono aumentati di volume, spesso di molte volte rispetto a un normale linfonodo (Mengeling et al., 2000). Inizialmente edematosi e moderatamente duri diventano in seguito duri, di colorito bianco o chiaro con un pattern nodulare o diffuso. Il linfonodo può rimanere aumentato di volume per 6 settimane o più (Mengeling et al., 2000).

**Feti:** figliate infette da PRRSV contengono un numero variabile di suini normali, piccoli e deboli e suini morti che possono essere morti nel post-partum o nati morti altrimenti mummificati. Le lesioni includono: edema perirenale, del legamento splenico e del mesentere; ascite, idrotorace e idroperitoneo. Emorragie segmentali con allargamento del cordone ombelicale possono essere presenti in suinetti nati deboli (Zimmerman et al., 2006).

### 6.4 LESIONI MICROSCOPICHE

**Polmoni:** i setti alveolari sono dilatati da macrofagi, linfociti e cellule plasmatiche. Gli alveoli possono contenere macrofagi necrotici, detriti cellulari e fluido sieroso mentre linfociti e cellule plasmatiche formano delle cuffie attorno alle vie aeree e ai vasi ematici.

**Linfonodi:** le lesioni microscopiche sono prevalentemente a carico dei centri germinali che appaiono necrotici e depleti. Le corticali possono contenere micro-cisti, variabilmente delineate da endotelio, contenenti un fluido proteinaceo misto a linfociti.

**Cuore:** vasculite linfoistiocitica multifocale da leggera a moderata e miocardite perivascolare possono svilupparsi nel cuore da 9 DPI.

**Cervello:** leucoencefalite linfoistiocitica leggera o encefalite coinvolgente il cervelletto, il cervello e tronco cerebrale possono svilupparsi a partire da 7 DPI. Si possono inoltre osservare un avvolgimento non costante dei vasi sanguigni da parte di linfociti e macrofagi.

**Reni:** sono stati descritti lievi aggregati linfoistiocitici in posizioni periglomerulari e peritubulari. I vasi interessati presentano un endotelio rigonfio, raccolte di fluido proteinaceo subendoteliali, aggregati di linfociti e macrofagi intramurali e perivascolari.

**Mucosa nasale:** l'epitelio può presentare ciglia raggruppate o completamente assenti, cellule rigonfie e metaplasia squamosa.

**Utero:** il miometrio e l'endometrio sono edematosi con "cuffs" perivascolari linfocitici. Può anche essere presente una vasculite segmentale linfocitica nei piccoli vasi e una microseparazione tra l'epitelio endometriale e il trofoblasto placentare.

**Testicoli:** atrofia dei tubuli seminiferi è osservata intorno a 7-25 DPI, associata con apoptosi e deplezione delle cellule germinali (Zimmerman et al., 2006).

## 7. Controllo

L'obiettivo del controllo di PRRS è di limitare gli effetti della circolazione virale nelle varie fasi di allevamento e di raggiungere e proteggere la stabilità della mandria.

Fondamentali per il controllo di una malattia così subdola sono le misure di biosicurezza, già citate ma che esploreremo meglio nella parte introduttiva alla parte sperimentale (pag. 39).

Il primo passo per controllare la diffusione del virus è l'analisi e la classificazione della situazione sanitaria dell'allevamento. Una volta che lo stato degli animali è chiaro sarà possibile applicare le tecniche di controllo ed eliminazione più adatte al caso dell'allevamento in esame.

### 7.1 MONITORAGGIO DELLA STABILITÀ DELL'ALLEVAMENTO

Al fine di semplificare la comunicazione tra le varie parti coinvolte nel management sanitario di un'azienda è stata creata da Holtkamp et al. una classificazione per gli allevamenti da riproduzione, con o senza suinetti in crescita.

In tale classificazione gli allevamenti sono divisi in 4 categorie: Positivo instabile (categoria 1), Positivo stabile (categoria 2), Negativo in previsione (categoria 3) e Negativo (categoria 4). La 2° categoria è ulteriormente divisa in due sottocategorie: Positivo stabile (2-a) e Positivo stabile in corso di eradicazione (2-b).

Se l'allevamento stabula solo suinetti in crescita viene classificato solo come Positivo o Negativo.

La classificazione per il PRRSV è basata sia sull'eliminazione del virus che sullo stato di esposizione dell'allevamento.

<b>Herd category</b>	<b>Shedding status</b>	<b>Exposure status</b>
<b>Positive Unstable (I)</b>	Positive	Positive
<b>Positive Stable (II-A)</b>	Uncertain	Positive
<b>Positive Stable (II-B) (Undergoing Elimination)</b>	Uncertain – undergoing elimination	Positive
<b>Provisional Negative (III)</b>	Negative	Positive
<b>Negative (IV)</b>	Negative	Negative

Fig. 4 Classificazione degli allevamenti in relazione allo stato di eliminazione e di esposizione

I test per verificare l'eliminazione del virus includono il ritrovamento diretto del virus tramite PCR, che è il gold standard, o per isolamento del virus.

L'esposizione è determinata solitamente tramite test ELISA ma anche con IFA (immunofluorescent antibody) o IMPA (immunoperoxidase monolayer assay).

Per la classificazione dell'allevamento il monitoraggio viene eseguito solo su sottopopolazioni rilevanti come gli animali adulti in riproduzione, suinetti pre e post svezzamento, rimonta e animali in crescita.

Lo stato di eliminazione di PRRSV è classificato come negativo, incerto o positivo.

Uno stato negativo viene attribuito quando vi sono informazioni sufficienti per sostenere che non vi sia eliminazione del virus in allevamento.

Al contrario uno stato positivo è supportato da prove cliniche e diagnostiche di eliminazione e trasmissione virale in allevamento; tale stato è inoltre attribuito a tutti gli allevamenti le cui informazioni sanitarie sono deficitarie.

Uno stato di eliminazione virale incerto è invece attribuito quando i dati diagnostici suggeriscono che non vi sia eliminazione ma senza la certezza sufficiente a garantire che vi sia una negatività completa. Di solito tale situazione è causata da un campionamento e una qualità dei test insufficienti.

Lo stato di esposizione è invece classificato come positivo o negativo.

Lo stato negativo è il risultato dell'assenza di un'esposizione precedente al test supportata dall'assenza di anticorpi contro il virus.

I criteri e le prove richieste per classificare un allevamento sono le seguenti (Holtkamp et al., 2011):

CATEGORIA DI ALLEVAMENTO	CRITERI	PROVE RICHIESTE
<b>Positivo Instabile (cat. 1)</b>	Virus ritrovato in allevamento accompagnato da segni clinici compatibili con PRRS. Gli allevamenti che non rispettano i criteri per le altre categorie vengono inclusi in questa di default.	Nessuna. Allevamenti non testati vengono inclusi in questa categoria di default. Il ritrovamento del virus nei tessuti e la presenza di segni clinici confermano tale stato
<b>Positivo Stabile (cat. 2-a)</b>	Vengono incluse in tale categoria allevamenti con assenza di viremia in suinetti in svezzamento per più di 90 giorni con assenza di nessun segno clinico nel comparto riproduttivo. L'allevamento non ha iniziato il processo di eradicazione.	PCR sul siero ogni 30 giorni con 4 test negativi consecutivi e nessun segno clinico compatibile con PRRS.

CATEGORIA DI ALLEVAMENTO	CRITERI	PROVE RICHIESTE
<b>Positivo Stabile in corso di Eradicazione (cat. 2-b)</b>	Valgono gli stessi criteri della categoria 2-a ma l'allevamento ha cominciato ad applicare un protocollo di eradicazione per diventare Negativo al virus.	PCR sul siero ogni 30 giorni con 4 test negativi consecutivi e nessun segno clinico compatibile con PRRS.
<b>Negativo Provvisorio (cat. 3)</b>	La 3° categoria comincia 60 giorni dopo la prima introduzione di una rimonta negativa con test per verificare che rimanga non infetta. Se nella stessa struttura è presente anche l'ingrasso dei suinetti è richiesto un monitoraggio in tale sottopopolazione per verificarne la negatività.	Test sul siero per la rimonta eseguiti con ELISA. Nessun risultato positivo, dopo aver escluso falsi positivi, per almeno 60 giorni dopo l'introduzione della rimonta. I test sull'ingrasso sono eseguiti con metodica ELISA. Nessun risultato positivo dopo aver escluso falsi positivi.
<b>Negativo (cat. 4)</b>	La categoria 4 comincia quando tutti gli animali precedentemente infetti sono stati rimossi dall'allevamento.  Alternativamente comincia 1 anno dopo che l'allevamento è stato classificato in categoria 3 se tutti gli animali sono sieronegativi.  Sono stabiliti Negativi gli allevamenti dopo aver eseguito un completo spopolamento e ripopolamento.  Se i suini in ingrasso sono presenti in allevamento è richiesta una conferma dello stato negativo di esposizione.	Test sierici in animali in riproduzione sono eseguiti con metodica ELISA. Nessun positivo dopo aver escluso i falsi positivi.  Test sierici in animali in riproduzione sono eseguiti con metodica ELISA. Nessun positivo, dopo aver escluso i falsi positivi, dopo un anno dalla classificazione in categoria 3.  Test sierici in animali in riproduzione sono eseguiti con metodica ELISA. Nessun positivo, dopo aver escluso i falsi positivi, 30 giorni dopo il ripopolamento con rimonta negativa.  Test sierici in animali in riproduzione sono eseguiti con metodica ELISA. Nessun positivo dopo aver escluso i falsi positivi.

## 7.2 TECNICHE DI MANAGEMENT

Le tecniche di management degli animali sono fondamentali per evitare che il virus diffonda liberamente in allevamento. Tanto più sofisticato è il metodo di allevamento tanto più sofisticate devono essere le tecniche di prevenzione adottate. Per esempio in allevamenti integrati,

come lo sono quelli in esame in questa tesi, le misure di biosicurezza, intese come l'insieme di misure adottate per prevenire l'introduzione e limitare la diffusione di agenti patogeni, devono essere altissime dato l'alto numero di potenziali contatti inter- e intra-filiera che possono avvenire quando gli animali vengono allevati in diverse fasi separate spazialmente e temporalmente (Shi et al., 2010; Corzo et al., 2010).

**Tutto Pieno Tutto Vuoto:** Il "tutto pieno, tutto vuoto" è un sistema di allevamento che prevede l'alternanza di un gruppo di animali destinati al macello, o alla fase di allevamento successiva, con l'introduzione di un nuovo gruppo accasato solamente a seguito di una pulizia accurata delle superfici e delle attrezzature entrate in contatto con gli animali e di un periodo di 5-7 giorni di non utilizzo del locale. Questa fase è chiamata di "vuoto sanitario" ed è utilizzata al fine di interrompere il trasferimento di agenti infettivi all'interno di gruppi di animali.

E' estremamente importante, al fine di una corretta applicazione del tutto pieno tutto vuoto, che i cicli siano sincronizzati in modo da consentire all'allevatore di compiere tutte le operazioni previste nel protocollo di igiene. Gli animali che subentreranno in allevamento dopo il periodo di vuoto sanitario troveranno un ambiente privo dei potenziali patogeni eliminati dal gruppo precedente riducendo al minimo la possibilità di trasmissione.

Questa tecnica di allevamento si presta particolarmente al mondo dell'allevamento multisito proprio per l'alternanza ciclica dei gruppi di animali nei vari allevamenti.

**Controllo degli ingressi:** Per evitare possibili contaminazioni dell'allevamento causate dal personale, lavoratore o non, è utile costruire un registro degli ingressi e regolamentare questi ultimi impedendo l'ingresso a personale e veicoli non strettamente coinvolti con l'allevamento. Inoltre il personale lavoratore non deve detenere animali di specie sensibili, non deve avere contatti con altre aziende e deve utilizzare abiti adibiti esclusivamente per l'azienda.

**Acclimatamento:** Come abbiamo già detto precedentemente la sottopopolazione chiave per il controllo del PRRSV nel comparto riproduttivo è quella delle scrofette rimontate (Batista et al., 2004; Zimmerman et al., 2006).

La rimonta, qualora non avesse sviluppato un'immunità protettiva prima dell'ingresso in allevamento, sarebbe suscettibile all'infezione da PRRSV e potrebbe causare una ricircolazione virale in allevamento.

Inoltre se le scrofette diventassero viremiche durante la gestazione rappresenterebbero una fonte virale per l'allevamento causando una trasmissione ai suinetti neonati (Corzo et al., 2010)

L'acclimatamento prevede l'esposizione della rimonta siero-negativa ai ceppi aziendali per un periodo di tempo sufficiente a far sì che gli animali si infettino, si riprendano dalla malattia e sviluppino una immunità propria (Fano et al., 2005; Vashisht et al., 2008).

Le scrofette possono essere introdotte solamente dopo la fine della viremia, testandole con metodica RT-PCR, poiché in quel momento non costituiscono più una fonte di infezione per gli altri animali (Zimmerman et al., 2006).

Tale processo è stato descritto causare una stabilizzazione dei segni clinici e un miglioramento degli indici di produzione (Zimmerman et al., 2006).

Negli anni sono stati descritti vari programmi di acclimatemento, molti di questi utilizzano i suinetti svezzati come fonte di virus per le scrofette.

Tuttavia nel lungo periodo, man mano che l'allevamento diventa immune, l'eliminazione del virus si riduce all'aumentare del numero di animali PRRSV-negativi.

L'infezione naturale delle scrofette in questi casi può diventare difficile rendendo perciò importante assicurarsi che la trasmissione di PRRSV dai suini donatori stia avvenendo efficacemente.

Ulteriori metodi di esposizione possono prevedere l'uso di vaccini o l'inoculazione, in animali negativi, di siero proveniente da animali viremici della stessa azienda. Quest'ultimo metodo è valido nell'assicurare la sierconversione degli animali inoculati ma, oltre ad essere laborioso, porta con se il rischio di trasmissione di altri patogeni.

**Controllo del seme:** Sapendo che PRRSV può essere trasmesso alle scrofe grazie al seme (Nielsen et al., 1997; Yaeger et al., 1993) è imperativo evitare l'introduzione di seme contaminato in allevamento.

Ad oggi la maggior parte dei verri utilizzati per la raccolta di seme sono negativi e vengono testati in maniera routinaria per verificare la presenza del virus qualora si verificasse un'infezione.

**Tecnica McRebel:** McCaw nel 2000 introdusse un nuovo metodo di controllo per la diffusione dei patogeni nei suinetti. McRebel sta per "Management changes to reduce exposure to bacteria to eliminate losses".

Sono incluse misure come la riduzione al minimo dei pareggiamenti delle figliate, l'eliminazione di suinetti non responsivi alle terapie, l'utilizzo dello stesso ago limitato alla stessa figlia e l'aumento delle cure nei confronti dei suinetti più piccoli e deboli.

Allevamenti che non utilizzano le pratiche di management McRebel sono stati dimostrati avere una ri-circolazione ricorrente del virus nella popolazione suina (Polson et al., 2010).

**La vaccinazione:** Un'altra tecnica studiata per il controllo di PRRSV in allevamento è quella della vaccinazione.

Tale pratica presenta notevoli problemi, PRRSV è infatti un "bersaglio mobile" e la continua variabilità genetica, quindi fenotipica, complica la realizzazione di una strategia vaccinale efficace. PRRSV inoltre è molto difficile da aggredire per l'ospite poiché il sistema immunitario presenta delle *défaillances* indotte dall'interazione con il virus come per esempio l'induzione di

bassi livelli di interferone, la crescita tardiva dei titoli di anticorpi neutralizzanti e l'inefficacia delle cellule natural-killer e dei linfociti T citotossici.

Solamente gli anticorpi neutralizzanti e altri meccanismi ancora sconosciuti sono in grado di contrastare PRRSV e sono proprio questi meccanismi che un vaccino ideale dovrebbe andare ad attivare.

Per evitare la replicazione e la trasmissione del virus a livello di allevamento può essere utile utilizzare:

- I. **Vaccini vivi attenuati** sono stati dimostrati essere efficaci nel ridurre la mortalità, la frequenza di comparsa della malattia, la severità della malattia, la durata della viremia, l'eliminazione del virus quando poi infettati con un ceppo eterologo (Scotti et al., 2006; Martelli et al., 2007; Kimman et al., 2009). Sono inoltre stati somministrati ripetutamente in popolazioni infette e il numero di persistentemente infetti e di animali che eliminano il virus sono apparentemente diminuiti (Cano et al., 2007).
- II. **Vaccini inattivati** sono stati descritti migliorare il tasso di parti, il ritorno in estro e il numero di suinetti svezzati per scrofa in popolazioni in cui PRRSV è presente in forma endemica (Alexopoulos et al., 2005). In altri casi è stato invece dimostrato come vaccini inattivati commerciali non abbiano fornito agli animali una protezione quando poi infettati sperimentalmente (Zuckermann et al., 2007; Reicks et al., 2010; Amadori et al., 2014).

E' evidente però che la protezione data dalla vaccinazione è solo parzialmente efficace nel proteggere gli animali ma l'opinione attuale è che l'efficacia del vaccino sia legata con una immunità cellulo-mediata efficiente quindi alla capacità del vaccino di causare una risposta immunitaria (Scotti et al., 2006; Kimman et al., 2009; Martelli et al., 2009; Young, 2015).

## 8. Eradicazione

Negli ultimi anni varie metodiche sono state testate per riuscire a definire un protocollo di eradicazione per PRRSV da allevamenti infetti.

Un piano di eradicazione di successo richiede strategie di controllo efficienti, che preparino una popolazione libera dal virus e che richieda strette misure di biosicurezza per prevenire che la popolazione si re-infetti (Zimmerman et al., 2006).

Una volta raggiunto lo stadio in cui il virus non circola più all'interno dell'allevamento è obbligatorio, per non vanificare i propri sforzi, comprare la propria rimonta da allevamenti PRRSV-free che partecipino ad un programma di certificazione. Anche il seme, come la rimonta, dovrebbe essere comprato da centri riconosciuti per essere esenti da PRRSV (Nodelijk et al., 2003).

Alcuni metodi di eradicazione sono stati dimostrati essere efficaci nell'eliminare PRRSV da popolazioni infette. Purtroppo alcune volte il valore scientifico di tali metodi è spesso limitato dal basso numero di allevamenti e di animali coinvolti, dal periodo di osservazione inadeguato per valutare effetti a lungo termine e da una mancanza di condizioni e controlli standardizzati. Inoltre spesso è difficile capire se i risultati degli studi americani possano essere applicabili anche ai casi europei (Nodelijk et al., 2003).

### 8.1 TEST E RIMOZIONE

Metodi di test e rimozione degli animali sono risultati essere di successo per eliminare PRRSV da popolazioni positive. Il principio alla base di tale tecnica è quello di raccogliere campioni di siero da tutte le femmine in riproduzione con il fine di sottoporli a test ELISA e RT-PCR per la ricerca di anticorpi e acidi nucleici virali.

Gli animali che risultano positivi a uno dei due o ad entrambi vengono eliminati (Dee et al., 1998; Dee et al., 2001; Dee et al., 2003).

Gli allevamenti candidati all'utilizzo di questa tecnica sono in località isolate, senza nessun episodio clinico da 12 mesi, con nessuna indicazione di ri-circolazione del virus e dove la presenza di animali persistentemente infetti è considerata un potenziale rischio per il fallimento del programma (Zimmerman et al., 2006).

Sebbene molto efficace nell'eliminare PRRSV da popolazioni infette endemicamente il metodo presenta alcuni svantaggi come l'alto costo delle procedure diagnostiche e il potenziale rischio di eliminare animali esposti in passato che non hanno più il virus (Cho et al., 2006).

I test devono essere altamente specifici e sensibili perché qualora eliminassimo un falso positivo avremmo eliminato un animale sano con un inutile costo, mentre nel caso di un falso negativo il rischio è quello di mantenere il virus in allevamento permettendone la diffusione.

## **8.2 DEPOPOLAMENTO E RIPOPOLAMENTO**

Il depopolamento totale o parziale è stato dimostrato essere un mezzo efficiente per controllare la diffusione di PRRSV all'interno e tra vari gruppi di suini (Blanquefort et al., 2000).

Tale metodo prevede l'eliminazione dall'allevamento di tutti gli animali riproduttori e all'ingrasso, la disinfezione delle strutture e il ripopolamento con suini PRRSV negativi (Corzo et al., 2010).

Elementi chiave per mantenere questa strategia sono l'acquisto esclusivo di animali esenti da PRRSV e l'utilizzo consistente di test diagnostici per ogni singolo gruppo di animali che entra in allevamento.

Nonostante il successo ottenuto nell'eliminazione del virus questa tecnica presenta alcuni svantaggi come l'impossibilità di preservare il materiale genetico e un aumento complessivo dei periodi morti nella produzione. L'aumento dei costi di produzione lo rende pratico solamente in allevamenti a ciclo chiuso dove l'attiva replicazione di PRRSV non permette l'eliminazione del virus con altre tecniche (Zimmerman et al., 2006).

Un depopolamento parziale è indicato per l'eradicazione del virus da gruppi di suini in crescita dopo che il virus ha smesso di essere eliminato. Questa tecnica può essere sufficiente in piccoli allevamenti (<500 scrofe) mentre in altri più consistenti potrebbe essere richiesta l'applicazione di ulteriori strategie (Zimmerman et al., 2006).

## **8.3 CHIUSURA DELL'ALLEVAMENTO**

Descritto per la prima volta da Torremorell et al. nel 2003 questo metodo è diventato nel tempo il protocollo più utilizzato per l'eradicazione di PRRSV da allevamenti da riproduzione.

La chiusura dell'allevamento consiste nella cessazione dell'introduzione di rimonte per un periodo che va dai 6 agli 8 mesi in relazione al caso, contemporaneamente si esegue l'eliminazione degli animali sieropositivi. Il risultato è quello di una diminuzione degli animali suscettibili in cui il patogeno può replicare favorendo di conseguenza l'eradicazione del virus dall'allevamento.

Tale metodo è stato descritto essere il metodo meno costoso per eliminare PRRSV (Yeske, 2010).

Nonostante permetta il mantenimento delle genetiche dell'allevamento con minimi costi diagnostici può causare la produzione di animali poco uniformi e a lungo termine la perdita di animali in riproduzione. Questi effetti possono essere minimizzati con l'uso di un altro allevamento distante dal primo in cui si possa allevare la rimonta di scrofette (Cho et al., 2006; Zimmerman et al., 2006).

#### **8.4 ERADICAZIONE REGIONALE**

L'eradicazione di PRRSV da un singolo allevamento sfruttando le caratteristiche biologiche del virus è diventato negli anni relativamente facile. Quello che queste tecniche non riescono prevenire è una re-infezione.

Una strategia vincente per ridurre il rischio di reintroduzione del virus è stata dimostrata essere l'estensione dei controlli sanitari a livello regionale. Questo approccio ha permesso al Chile di riuscire ad eliminare il virus dopo un programma di sorveglianza nazionale coordinato dalle autorità governative, le industrie locali e i veterinari del settore (Torremorell et al., 2008).

Un altro lavoro molto ben dettagliato è stato effettuato da Corzo et al. nel 2010 nella contea di Stevens in Minnesota.

La tecnica prevede vari step che possiamo riassumere così:

- I. Definizione dei confini della regione adatta a condurre un processo di eradicazione per PRRSV e determinazione del livello di partecipazione al piano di eradicazione. Tale regione può essere definita da confini naturali o costruiti dall'uomo, l'importante è che gli allevamenti siano spazialmente separati. Il grado di successo di un programma del genere dipende ampiamente dal livello di partecipazione e di comunicazione tra produttori, veterinari e fornitori.
- II. Raccolta dei dati dell'allevamento e della densità animale.
- III. Determinazione dello stato sanitario di ogni allevamento. Viene utilizzata una combinazione di RT-PCR e test ELISA. La definizione dello stato dell'allevamento avviene in linea con quanto descritto da Holtkamp et al. (2011) (pag. 28).
- IV. Definizione dei livelli di biosicurezza e del livello di rischio di reintroduzione del virus per ogni allevamento. Spesso viene utilizzato lo strumento PADRAP (Production Animal Disease Risk Assessment Program) per definire il livello di biosicurezza.
- V. Mappare i movimenti dei suini tra gli allevamenti e all'interno della regione oltre che a definire i flussi in ingresso da altre regioni. Questo viene fatto poiché il rischio più grande è l'introduzione nella regione controllata di suini infetti da PRRSV. Una situazione ottimale per l'eradicazione del virus si presenta quando le fonti principali di suini sono confinate all'interno della stessa regione in esame.

- VI. Implementazione delle strategie di controllo dell'allevamento con scrittura di report dei progressi riscontrati.
- VII. Sorveglianza per verificare che gli allevamenti PRRSV-negativi (categoria 4) rimangano tali. Il metodo di controllo più utilizzato è la sierologia diagnostica. La frequenza con la quale vengono eseguiti i test è variabile ma devono essere condotti almeno 2 volte all'anno. Tale monitoraggio deve essere sempre accompagnato da un'attenta osservazione di eventuali segni clinici associati a PRRS.

Concludendo è quindi importante ricordare come nonostante sia possibile l'eradicazione da un allevamento ciò non è convenientemente praticabile nella realtà della situazione suinicola ed epidemiologica italiana a meno che gli allevamenti interessati non presentino condizioni particolari come l'isolamento geografico.

E' infatti molto difficile mantenere lo stato di negatività in aree densamente popolate da allevamenti suini (Holtkamp et al., 2010).

Proprio per casi del genere si stanno cercando approcci all'eliminazione regionale basati sulla formazione di cluster di allevamenti, l'attribuzione di fattori di rischio connessi al tipo di allevamento e un'analisi sempre più attenta del flusso di suini che attraversano la regione (Fahriou et al., 2014).

# Parte Sperimentale

# 1. Introduzione

Analogamente a quanto si sta verificando nel resto della Comunità Europea il mondo suinicolo italiano in questi ultimi anni è stato interessato da profondi cambiamenti strutturali e organizzativi. Agli inizi degli anni 2000 in Italia si contavano 156.818 allevamenti mentre dopo 10 anni ne sono rimasti solamente 26.000 con un patrimonio totale di circa 8.661.500 capi. La distribuzione sul territorio italiano non è omogenea infatti solo nel nord Italia si contano 7.391.471 suini.

Da sola la Lombardia e in particolare le province di Pavia, Lodi, Cremona, Bergamo, Brescia e Mantova ospitano 4.678.658 capi, cioè più del 50% dell'intero patrimonio suinicolo nazionale (ESRAF report 2013).

Nel 2013 si è registrata una contrazione del numero di animali di circa il -8.1% rispetto al 2010 (dati Eurostat), tale riduzione ha interessato in particolar modo il comparto delle scrofe in seguito alla ripresa delle tensioni sui prezzi delle materie prime e all'adeguamento alle norme comunitarie sul benessere animale che prevedevano il divieto di stabulazione in gabbia per le scrofe gestanti.

Anche l'organizzazione degli allevamenti sta mutando a favore di strutture sempre più grandi tanto che le 3 aziende integrate più grandi, grazie alla produzione multi-sito e a contratti di soccida, controllano circa il 20% del mercato, le seguenti 10 aziende rappresentano un altro 15-20% del mercato. Gli allevamenti che possiedono meno di 500 scrofe stanno scomparendo mentre gli allevamenti a ciclo chiuso con un numero di scrofe tra i 500 e i 2000 sono ancora molto competitivi.

## 1.1 MULTISITE PRODUCTION

Tutti i campioni utilizzati nella nostra ricerca provengono da una grande filiera del nord Italia organizzata con la tecnica del multisite production.

La produzione multisito è una tecnica logistica che prevede la divisione geografica dei vari allevamenti coinvolti nelle diverse fasi di riproduzione, svezzamento e ingrasso che si compiono quindi in allevamenti (siti) diversi.

Tale scelta, nella produzione del suino allevato, è spinta da motivazioni igienico-sanitarie e organizzative poiché i siti separati permettono un controllo molto più specifico di ogni singola fase dell'allevamento. Complessivamente si osservano una riduzione dell'incidenza di malattie cliniche, della mortalità, della necessità di trattamenti e quindi una riduzione complessiva dei costi di produzione, sempre se tale tecnica viene correttamente applicata.

Chiaramente tale tecnica sarà difficilmente applicabile in caso di piccoli numeri di animali in quanto richiede conoscenze, risorse finanziarie e capacità adeguate. Infatti moltiplicando i siti di produzione aumentano sia il rischio di site-infections (infezioni di un singolo sito produttivo), sia la quantità di trasporti richiesti perché un animale arrivi a fine ingrasso. Le prime possono avvenire nel caso che il programma di allevamento non sia gestito adeguatamente e non si possano applicare tutte le tecniche di controllo sanitario previste mentre i trasporti potrebbero rappresentare un rischio di infezione.

Anche le misure di biosicurezza applicate ora potrebbero non essere sufficienti a competere con il virus.

La produzione è divisa in 3 fasi:

La **riproduzione** rappresenta indubbiamente una fase strategica per la produzione poiché è in grado di condizionare profondamente la redditività dell'azienda. Gli indici di produzione stanno sensibilmente migliorando (dati CRPA) soprattutto nel numero di suini svezzati per scrofa all'anno (23.6 nel 2013) nonostante ci siano ampi margini di miglioramento. Tutte le attenzioni degli allevatori in questa fase vengono focalizzate nell'allevare animali sani che possano portare a termine le gravidanze e le lattazioni nel migliore dei modi.

Nel **post-svezzamento** i suinetti che provengono dalle sale parto vengono allevati a terra o in gabbiette e alimentati con mangimi ad alta digeribilità ed appetibilità. E' una fase molto delicata e la dieta gioca un ruolo fondamentale per lo sviluppo della funzionalità dell'organismo. L'alimento è somministrato in forma solida e ad libitum. Questa fase dura generalmente 55-60 giorni e il suinetto raggiunge il peso vivo di 30-32 Kg, adatto per il successivo trasferimento nella fase di accrescimento-ingrasso.

Nella fase di **accrescimento-ingrasso** si punta alla produzione del "suino pesante" dal peso di 165-170 Kg e di età di almeno 9 mesi, in accordo col Disciplinare DOP del Prosciutto di Parma e San Daniele. Questa fase ha una durata di circa 190-200 giorni e l'alimentazione viene data razionata con differenti tipi di mangime in base alla fase di crescita dell'animale. Tale gestione permette di ottimizzare gli indici di conversione alimentare e ottenere una carcassa dalle pregiate caratteristiche organolettiche riducendo il carico inquinante sull'ambiente. Di recente si sta sviluppando anche una nuova strategia per la produzione di un "suino intermedio" caratterizzato da un ciclo più breve e da un peso vivo di circa 130-145 Kg.

## 1.2 MANAGEMENT NEL MULTISITE PRODUCTION

Aumentando la sofisticazione del metodo di allevamento aumentano però anche le tecniche richieste per contenere i rischi di un'infezione. Sfruttando la tecnica del multisite production il numero di trasporti richiesti per portare un suino a fine allevamento aumenta e con essi anche

il rischio di contatti intra e inter filiera (Shi et al., 2013). Per evitare quindi una libera circolazione di patogeni, vista anche la densità degli allevamenti suinicoli nel nord Italia, bisogna ricorrere a sistemi di biosicurezza sempre più stringenti. Alcuni di questi sistemi sono puramente strutturali e richiedono un'attenta pianificazione dell'allevamento come per esempio le piazzole di carico/scarico dei materiali, le recinzioni perimetrali, le vie d'accesso, le aree di transito dei materiali, l'arco di disinfezione per i camion, la disposizione dei silos per il carico del mangime, la zona filtro per il personale in entrata (lavoratore e non), la zona atta alla procedura di conferimento degli animali morti e la zona di gestione della rimonta.

Vengono considerate misure di biosicurezza anche i protocolli di igiene per gli allevamenti come la tecnica, già citata precedentemente, del "tutto pieno tutto vuoto" e l'igienizzazione dei mezzi trasporto. Un fallimento di una qualsiasi di queste tecniche di prevenzione può causare l'ingresso del virus della PRRS in allevamento e, qualora fosse interessata una scrofaia, un interessamento a cascata di tutta la filiera.

Sta cominciando ad assumere quindi un ruolo importante anche l'utilizzo di tecniche di analisi filogenetica che, partendo dall'informazione di sequenze nucleotidiche ottenute da campioni PRRSV positivi, consente l'analisi epidemiologica molecolare sia a livello di singole filiere che di sistema di allevamento integrato nella sua completezza.

Tali tecniche, un tempo ignorate, permettendo di identificare gli stipiti circolanti in azienda, la loro possibile origine e quindi verificare la consistenza delle misure di biosicurezza nel prevenire un'infezione di un singolo ente produttivo.

Si tratta quindi di uno strumento assai utile per comprendere la storia dell'allevamento e, una volta costruito, consente con sforzi minori di poter continuare ad analizzare periodicamente il flusso virale nell'azienda valutando contemporaneamente tutte le filiere che la compongono.

## 2. Materiali e Metodi

### 2.1 I CAMPIONI

Le sequenze analizzate nel presente studio sono il frutto dalla collaborazione con una grande azienda integrata del nord Italia la quale ha fornito i campioni ottenuti durante la routinaria attività diagnostica. Bisogna quindi tenere presente come essi non siano quindi il frutto di uno screening sistematico della popolazione.

Gli allevamenti interessati sono dotati dei sistemi di biosicurezza più importanti come l'arco di disinfezione per i mezzi di trasporto, le zone di carico/scarico delle carcasse e del mangime poste lungo il perimetro dell'allevamento e la recinzione esterna.

I campioni risultati positivi alla real time RT-PCR (usando un kit commerciale) effettuata presso i loro laboratori di riferimento sono stati recapitati presso le strutture dell'area di malattie infettive, dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute per essere sequenziati.

Ciascun campione, identificato da una sigla univoca, era corredato da una serie di metadati quali: data di campionamento, azienda di origine (il che ne permette la geo-localizzazione), tipologia produttiva e filiera di appartenenza.

I dati sono stati raccolti e gestiti tramite creazione di un database in Excel®.

### 2.2 SEQUENZIAMENTO

L'RNA dei campioni è stato estratto utilizzando il kit commerciale High Pure RNA Isolation Kit (Roche diagnostics) e il gene virale ORF7 è stato amplificato tramite RT-PCR one step utilizzando i primers descritti da Oleksiewicz et al. (1998).

I prodotti di PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio addizionato con EuroSafe Nucleic Acid Staining Solution® (EuroClone S.p.A.) e visualizzati con il trans illuminatore Gel Doc XR Sistem® (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette) al fine di valutare la specificità e quantificarne la concentrazione.

Gli amplificati ottenuti sono stati quindi sequenziati, in entrambe le direzioni, con metodo Sanger utilizzando i medesimi primers impiegati per la RT-PCR.

Infine, la qualità dei cromatogrammi ottenuti è stata valutata in maniera preliminare tramite FinchTV (<http://www.geospiza.com>) e successivamente le sequenze consenso sono state assemblate utilizzando CromasPro (CromasPro Version 1.5) e salvate in formato FASTA rinominandole utilizzando il seguente schema: IdentificatoreUnivoco | Filiera | TipologiaProduttiva | Allevamento | Data di Campionamento. Per ciascuna di queste sono state eliminate le estremità 5' e 3' al fine di mantenere solamente il tratto corrispondente al gene ORF7.

Al fine di automatizzare il processo sono stati realizzati degli appositi script utilizzando il software statistico R (<http://www.R-project.org>).

### 2.3 ANALISI DELLE SEQUENZE

Le sequenze così ottenute, dopo essere state allineate con il programma MAFFT, sono andate a costituire il database di partenza per le successive analisi. Le relazioni fra i diversi stipiti sono state analizzate tramite la ricostruzione di un albero filogenetico utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood implementato in IQTREE. Il supporto di branca per le diverse clade è stato stimato utilizzando il test non-parametrico aLRT (Shimodaira–Hasegawa [SH]-aLRT), implementato nel medesimo programma. Il modello di sostituzione nucleotidica è stato selezionato sulla base del Bayesian Information Criterion (BIC) calcolato utilizzando il programma jModelTest 2.1.1. Il metodo di ricostruzione dell'albero filogenetico è descritto a fondo nell'articolo di Franzo et al., 2014.

L'albero così ottenuto ha permesso di evidenziare sia i rapporti fra le varie filiere che fra le diverse categorie produttive. Dopo una prima valutazione meramente grafica, si è proceduto con la ricostruzione, basata su modelli probabilistici, dell'intensità dei contatti (della frequenza) fra le diverse filiere e categorie produttive, considerate come caratteri discreti. Brevemente, la transizione fra un carattere e l'altro lungo l'albero filogenetico, è descritto matematicamente da una matrice di transizione, caratterizzata da tassi potenzialmente differenti per ciascuna coppia di stati. Sono stati valutati modelli di varia complessità: da matrici che prevedessero tassi di transizione uguali per tutte le coppie, a matrici di transizione simmetriche e asimmetriche. Il modello che meglio interpretava i dati in nostro possesso è stato selezionato tramite un likelihood ratio test.

Le analisi sopra descritte sono state effettuate utilizzando il pacchetto “ape” in R.

Infine, per valutare le relazioni fra le sequenze italiane e quelle campionate a livello mondiale, è stato prodotto un nuovo allineamento che includesse una raccolta completa delle sequenze di ORF7 depositate in Genbank.

L'albero filogenetico è stato ricostruito come precedentemente descritto.

## 3. Risultati e discussione

Procederemo nella discussione dei risultati di questa ricerca partendo dall'unità minima produttiva dell'azienda multisito in esame: la filiera. Esse sono costituite da una scrofaia e a cascata svezzatori e ingrassatori. Bisogna immaginare la filiera come una struttura piramidale dove in cima si trova la scrofaia e alla sua base, in numero sempre crescente, svezzatori e ingrassatori.

In teoria, grazie all'aiuto delle misure di biosicurezza, le filiere dovrebbero essere delle strutture indipendenti le une dalle altre, a tenuta stagna, e gli ingressi di materiale virale dovrebbero essere nulli al netto di quello che può verificarsi con l'introduzione di animali infetti, non eludibile in un sistema produttivo. Purtroppo, nonostante la loro efficiente organizzazione, le filiere non sono prive di difficoltà tecniche ed errori che possono portare a vanificare gli investimenti fatti per prevenire possibili contaminazioni.

### 3.1 DATASET

In totale dopo il sequenziamento, la rinomina e la pulizia dei campioni non corredati da tutti i metadati richiesti abbiamo ottenuto nel nostro database 639 sequenze provenienti da 25 filiere. I dati sono stati raccolti in un arco di tempo che va dal 2002 al 2015.

Il numero totale di unità produttive coinvolte nel progetto è di 107 allevamenti.

Suddivisi per tipologia produttiva si contano in totale 25 scrofaie, 58 svezzatori e 24 ingrassatori.

Il numero di sequenze ripartito per tipologia produttiva è di 404 sequenze per le scrofaie, 194 sequenze per gli svezzatori ed infine 41 sequenze per gli ingrassatori.

E' possibile osservare come l'intensità di campionamento sia molto più alta per le scrofaie e per gli svezzatori.

### 3.2 ANALISI DELLE FILIERE

Dagli alberi formati con le 639 sequenze ricavate dalle 25 filiere si riescono ad individuare multipli cluster virali comuni a più di una filiera, segno di multiple introduzioni.

Verranno presentati solo alcuni grafici particolarmente esplicativi della situazione epidemiologica, gli altri risultati non commentati direttamente in questo capitolo saranno disponibili nella sezione Appendice.

Nel grafico in figura 5 i rami terminali dell'albero, colorati diversamente in base all'appartenenza alle diverse filiere, mostrano come sequenze di singole filiere si inframmezzino con quelle di altre.

Un risultato del genere presenta una realtà molto diversa da quella ideale, le filiere infatti non sono separate come dovrebbero essere, ma anzi il passaggio di materiale virale avviene spesso tra le varie filiere della stessa azienda contribuendo in maniera non trascurabile all'evoluzione virale.

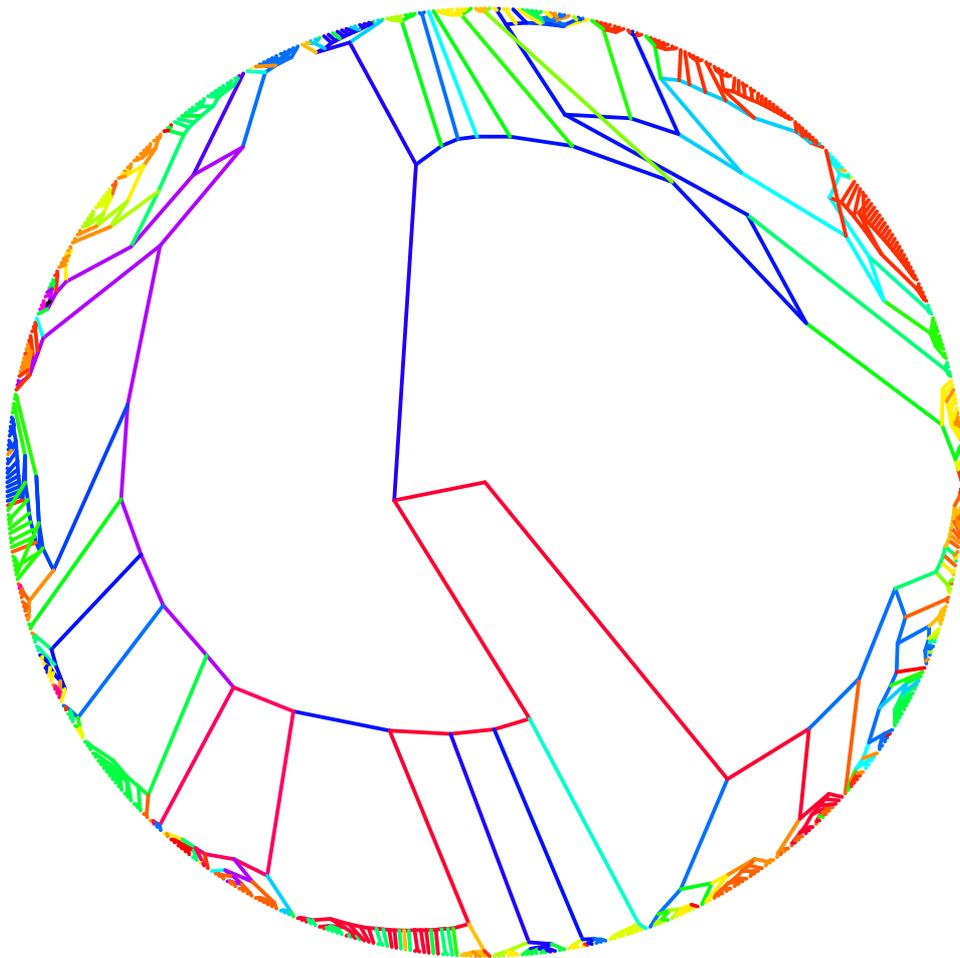


Fig. 5 Albero filogenetico generale

Osservando la situazione epidemiologica da una prospettiva di filiera la cosa appare ancora più chiara.

Nelle figure seguenti è riportato l'albero filogenetico dell'azienda in esame, contenente tutte le 639 sequenze in esame, su cui sono evidenziati graficamente con punti rossi le sequenze appartenenti alle singole filiere.

Dall'analisi dell'albero in figura 6 è possibile vedere la distribuzione dei 43 campioni appartenenti alla filiera 9 all'interno dell'albero filogenetico complessivo.

I campioni sono principalmente concentrati in un cluster spazialmente disposto nella zona bassa dell'albero.

Nonostante questo si rinvencono altre sequenze appartenenti alla stessa filiera in altre zone dell'albero, vicino a stipti virali geneticamente distanti dal cluster principale ed appartenenti ad un'altra filiera. Questo comportamento epidemiologico, generalmente desumibile dall'analisi globale delle sequenze (fig. 5), viene rinvenuto in modo più o meno evidente nelle diverse filiere, evidenziando la non perfetta segregazione biologica delle popolazioni virali delle singole filiere.

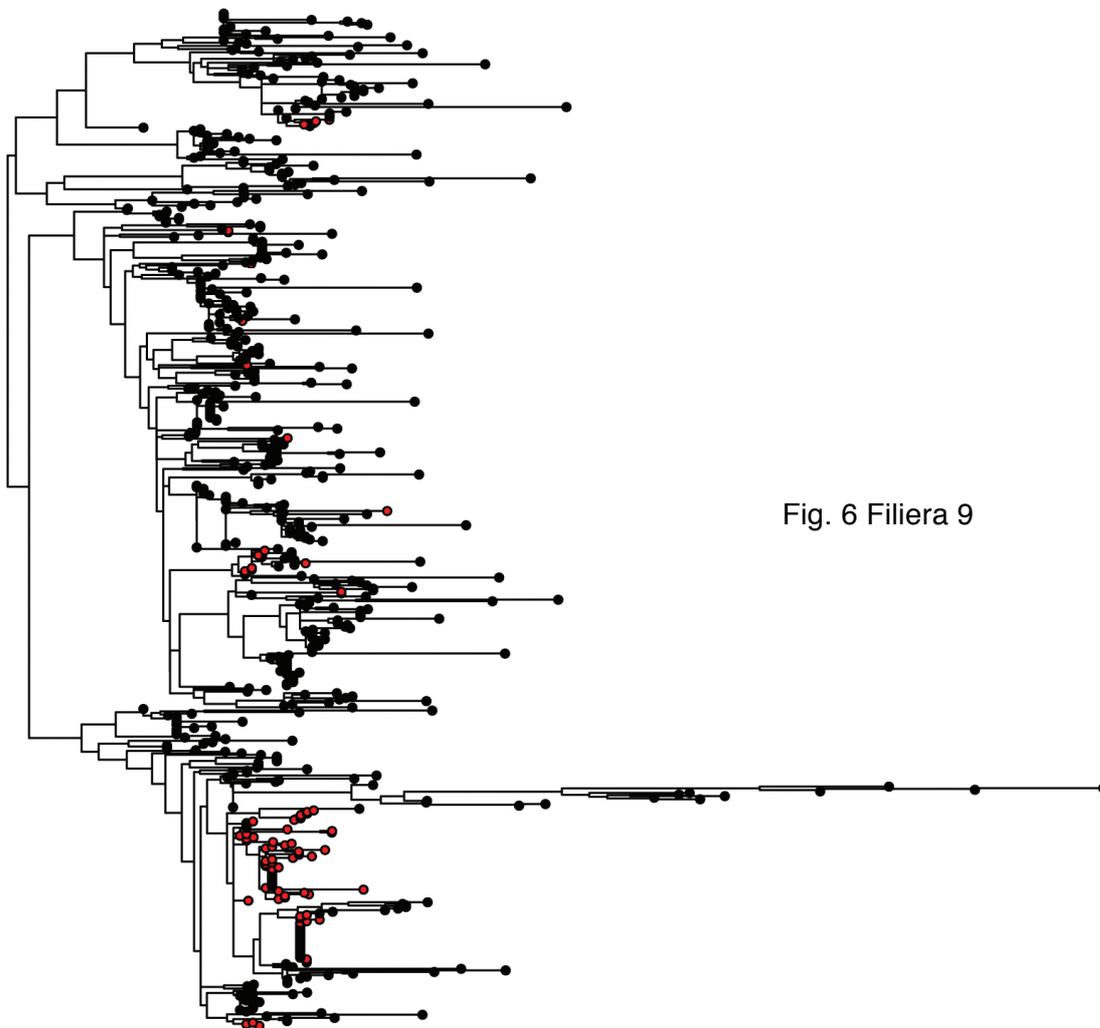
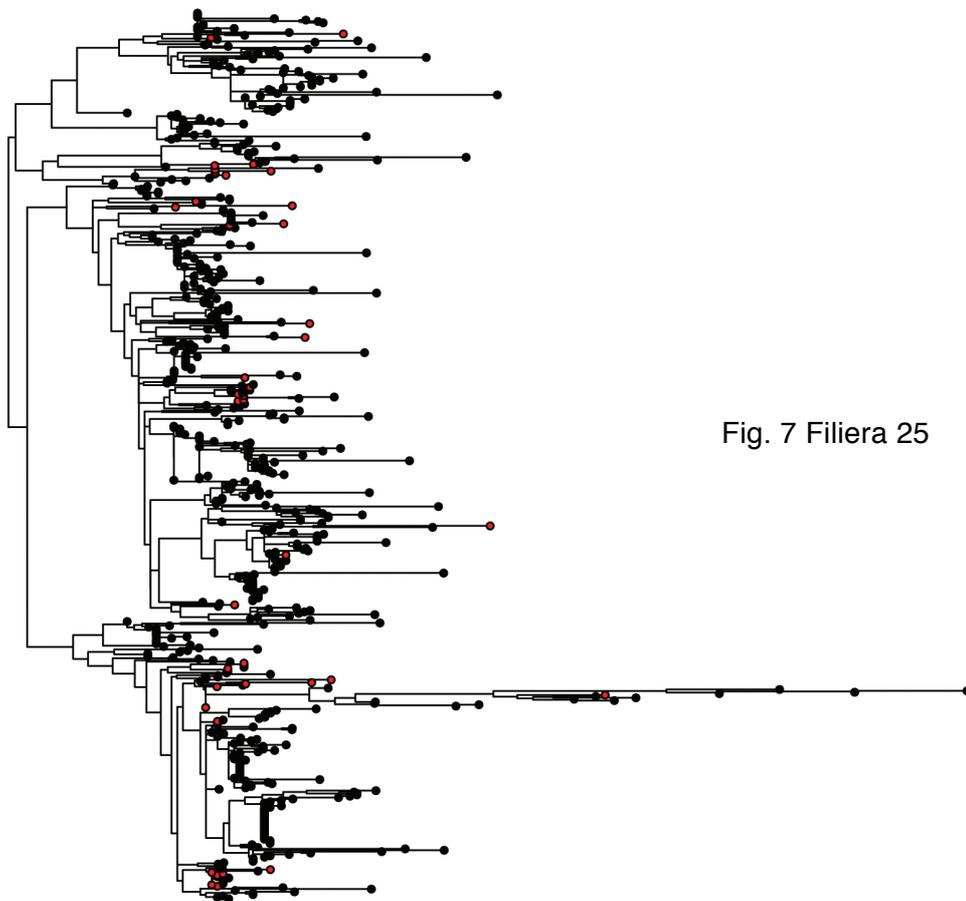


Fig. 6 Filiera 9

In figura 7 è possibile invece osservare come i 27 campioni della filiera 25 siano distribuiti in tutto l'albero, indicandoci un'eterogeneità degli stipiti sequenziati maggiore e una segregazione minore rispetto a quella della filiera 9.

Dall'analisi del comportamento epidemiologico delle due filiere qui presentate è possibile osservare come sebbene l'eterogeneità tra le sequenze sia comune ad entrambe nella seconda questa sia più accentuata. Tale comportamento può essere dovuto a fattori manageriali e sanitari che, non conoscendo intimamente la filiera nelle sue caratteristiche strutturali e manageriali, è possibile solo ipotizzare.



E' stato possibile ottenere un altro interessante risultato confrontando i 639 campioni con le sequenze più significative di provenienza italiana e mondiale depositate in GenBank.

Dal grafico in figura 8 è possibile osservare come le sequenze aziendali clusterizzino solo con le sequenze nella parte superiore dell'albero, appartenenti al PRRSV Tipo 1, essendo quelle rappresentate nella porzione sottostante del Tipo 2 di origine Nord-Americana.

Un'altra dovuta considerazione riguarda le sequenze aziendali (segnati in rosso) al centro dell'immagine. Esse infatti clusterizzano con alcune sequenze italiane (in colore verde) ed estere (in colore nero) appartenenti a: Repubblica Ceca, Slovacchia e Romania.

Il cluster nero (quindi di sequenze estere) che si vede inframmezzarsi tra le sequenze aziendali analizzate è formato da sequenze provenienti da Russia e Bielorussia. Tali Stati sono epidemiologicamente rilevanti dato il recente isolamento di PRRSV tipo 2 e tipo Lena (Karniychuk et al., 2010).

E' confortante quindi che le sequenze in esame non abbiano rapporti filogenetici con questo cluster russo e bielorusso in cui gli stipiti sono caratterizzati da una notevole patogenicità.

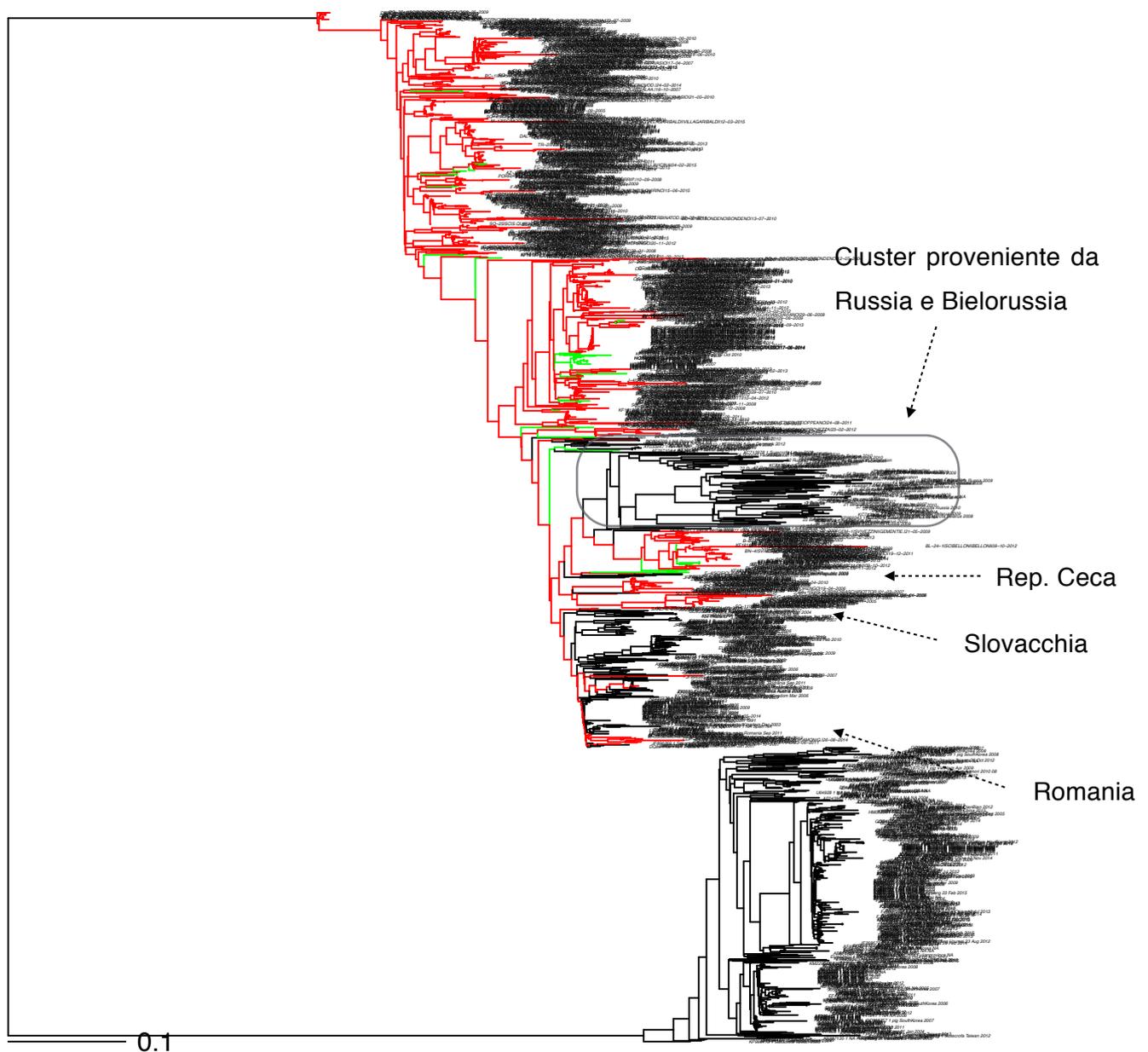


Fig. 8 Confronto delle sequenze aziendali con quelle mondiali, europee e italiane

### 3.3 FLUSSO GENETICO VIRALE

Utilizzando le sequenze in nostro possesso è stato possibile mettere in relazione il flusso di virus tra le diverse fasi dell'allevamento multisito (scrofaia, svezzamento e ingrasso) per verificare che il flusso fosse mantenuto e rispecchiasse il modello biologico atteso.

Il flusso virale, indicato nel grafico seguente, rispecchia quello che avviene anche nella realtà. È possibile vedere come il passaggio di virus avvenga prevalentemente tra le scrofaie e gli svezzatori e tra gli svezzatori e gli ingrassatori. È invece quasi nullo tra gli ingrassatori e le scrofaie.

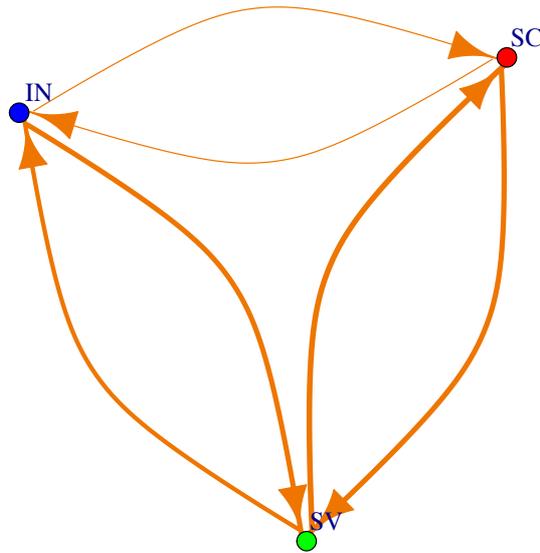


Fig. 9 Flusso genetico virale tra gli stadi di allevamento

Osservando attentamente il grafico è possibile vedere come anche il passaggio contrario, cioè dagli ingrassatori agli svezzatori e dagli svezzatori alle scrofaie, sia graficamente importante.

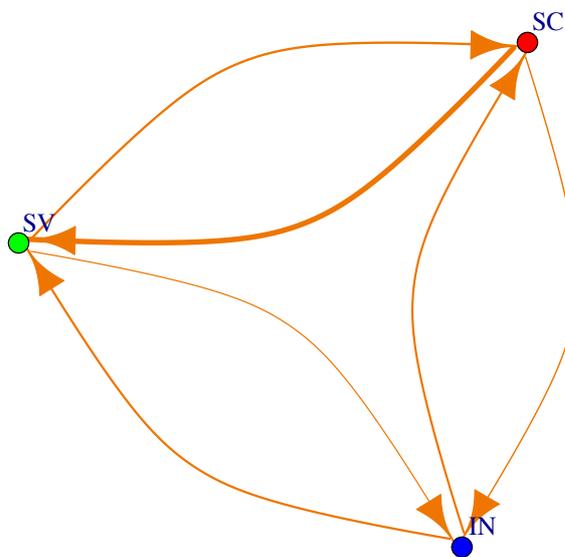
Non bisogna però pensare solamente ad un flusso di materiale virale che risale la filiera, ma anche ad un artefatto dovuto al campionamento e ad un aspetto computazionale.

Come già detto precedentemente, infatti, le sequenze utilizzate non sono il frutto di un campionamento sistematico degli allevamenti. I campioni vengono raccolti a fine diagnostico quando la malattia si presenta clinicamente in allevamento.

È possibile che durante un'epidemia in una filiera si campionino nello stesso arco di tempo animali sia nella scrofaia che negli svezzatori e siccome gli animali si muovono da un sito all'altro, condividendo lo stesso stipite virale, le sequenze clusterizzeranno tra di loro nell'albero filogenetico.

Quindi se due siti produttivi collegati tra loro vengono campionati durante un'epidemia clinica il software non sarà in grado di descrivere l'andamento del flusso se non in termini probabilistici. Lo script utilizzato infatti, analizzando l'albero filogenetico e le sequenze virali, calcola qual è il modello di transizione più favorevole perché l'evoluzione degli stipiti virali sia avvenuta nel modo descritto dall'albero filogenetico mostrandoci quindi anche il percorso inverso a quello biologico del virus.

Qualora invece l'analisi dell'albero filogenetico venga effettuata con un modello che viene informato del **fattore tempo** il risultato sarà quello del grafico in figura 10.



E' possibile osservare come il flusso virale tra svezzatori e scrofaie, prima molto accentuato, ora si sia minimizzato. Questo effetto è dovuto all'analisi della componente temporale che annulla gli artefatti precedentemente discussi, permettendo quindi di dimostrare come il flusso virale segua il "pig-flow" come precedentemente descritto.

Fig. 10 Flusso genetico virale analizzato con algoritmo informato del tempo

In figura 11 viene invece mostrato una porzione di albero costruito con un modello matematico informato del tempo. (L'albero completo è disponibile al link: [https://www.dropbox.com/s/060xxv74q11ztjh/Tree\\_datato\\_noname?dl=0](https://www.dropbox.com/s/060xxv74q11ztjh/Tree_datato_noname?dl=0))

E' possibile osservare come le sequenze provenienti dagli ingrassi (in colore rosso) originino da sequenze provenienti da svezzatori (colore azzurro), collegate a loro volta a quelle delle scrofaie (in colore marrone).

Il modello di propagazione illustrato nel grafico rispecchia il flusso genetico virale qui sopra descritto.

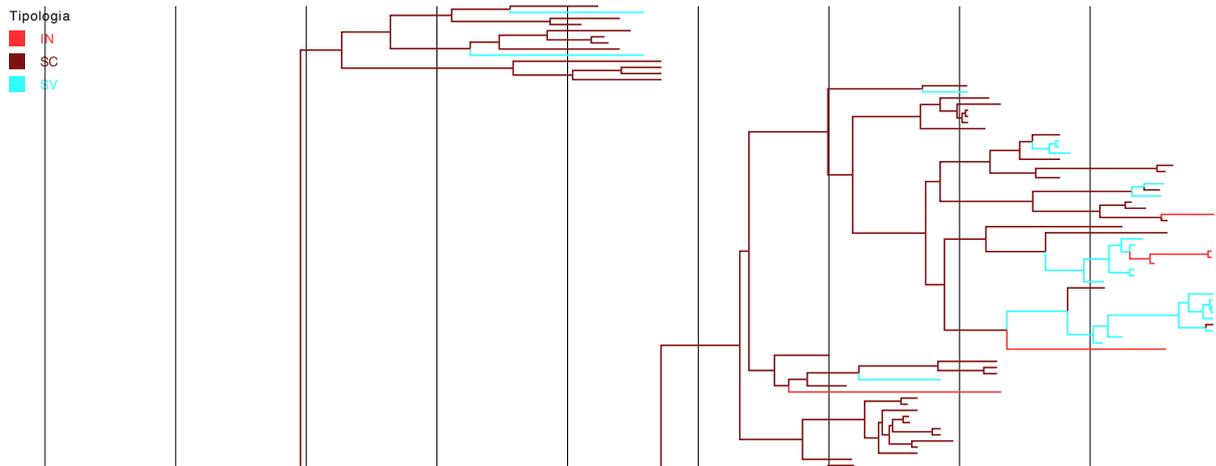


Fig. 11 Una porzione dell'albero filogenetico informato del fattore tempo

E' stato possibile osservare alcuni casi di "salto" di uno stadio di allevamento, mostrati anche in figura 12, principalmente dovuti al campionamento non costante temporalmente che causa, in sede di ricostruzione dell'albero filogenetico, un salto di uno step di allevamento.

E' possibile osservare come gran parte delle sequenze raccolte provengano dalle scrofaie. Tale effetto è dovuto anche al fatto che è più difficile eliminare il virus da questi siti a causa della loro tipologia di popolazione. Esse sono caratterizzate da una continua ciclicità della produzione di animali sensibili e non da un'alternanza di popolazioni.

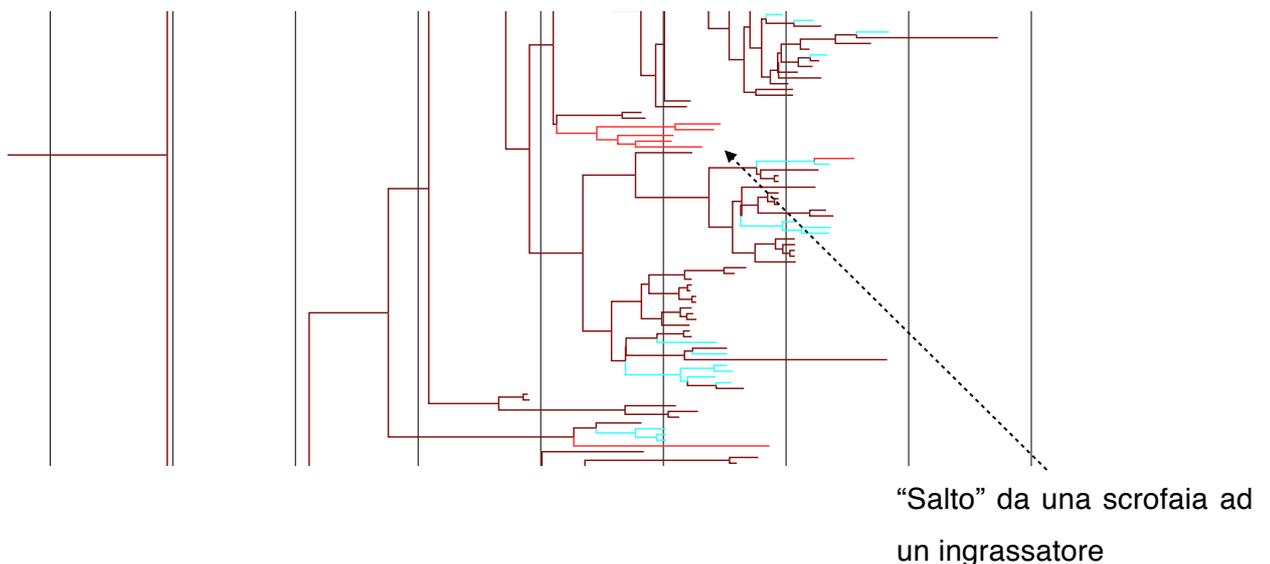


Fig. 12 Esempi di "salto" di stadio di allevamento

Quindi anche applicando un sistema di tutto-pieno tutto-vuoto negli svezzatori e negli ingrassatori il problema verrà risolto solo parzialmente perché nella scrofaia continueranno ad essere allevati animali infetti.

Nonostante questo problema la tecnica di biosicurezza sopracitata è comunque utile nel controllo della malattia riducendo la pressione infettiva e controllando gli altri patogeni che interessano gli allevamenti suini.

## 4. Conclusioni e prospettive future

Alla luce della corposa analisi effettuata grazie a moderne tecniche filogenetiche su una grossa azienda multisito del nord Italia abbiamo evinto che le filiere che la compongono, nonostante dovessero essere ipoteticamente indipendenti le una dalle altre, sono interconnesse tra di loro. Le sequenze virali sono infatti state osservate essere comuni a più di una filiera rendendo evidente come sia possibile che PRRSV contagi siti produttivi paralleli e che non dovrebbero mai entrare in contatto tra loro.

Il flusso di materiale virale, espresso graficamente sia in figura 10 che in figura 11, è concorde al movimento degli animali nella filiera confermando che il virus si muove con i suini tra i vari stadi di allevamento.

Inoltre le sequenze aziendali sono state osservate clusterizzare con altre sequenze italiane ed estere, suggerendo che PRRSV riesca a oltrepassare le misure di biosicurezza degli allevamenti.

E' quindi evidente come il virus sia un problema anche in una grande azienda integrata nonostante essa possa fare affidamento su personale e strutture dalle elevate capacità tecnico-sanitarie.

Al fine di migliorare l'indagine epidemiologica su PRRSV sarebbe utile poter analizzare le potenziali vie di contatto dirette e indirette tra gli allevamenti di filiere diverse come tutti quei mezzi connessi all'attività di allevamento e condivisi da ogni elemento dell'azienda integrata come i carri mangimi, il carro dei morti e il personale tecnico sanitario.

Per migliorare una ricerca improntata in quest'ottica nel database da noi costruito è già stata implementata la posizione, espressa in coordinate GPS, degli allevamenti coinvolti nel progetto. Grazie a questo dato potremo analizzare e descrivere i tipi di contatti tra le filiere anche in relazione alla distribuzione geografica e potenzialmente categorizzare gli allevamenti in base a fattori di rischio di infezione.

Anche i camion di trasporto per gli animali vivi, non ancora investigati a fondo da analisi epidemiologiche ad hoc, potrebbero essere dei mezzi di contagio. Non conoscendo il tipo di rapporti commerciali che l'azienda in esame ha con il trasportatore è stato impossibile in questa tesi riuscire a correlare i dati. Un'analisi di questo tipo però, qualora dovesse rivelarsi fruttuosa, porterebbe grandi vantaggi all'allevamento integrato riuscendo ad eliminare un potenziale mezzo di contatto frequentemente utilizzato al fine dell'allevamento suino.

Ad oggi purtroppo l'azienda, per motivi commerciali e di privacy, non ha fornito i dati produttivi degli allevamenti interessati nel progetto di analisi filogenetica. Sarebbe estremamente interessante correlare gli eventi epidemiologici con il trend delle produzioni per osservare in che modo tali valori siano collegati.

# Bibliografia

1. Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol.* 1997;55(1):309-16.
2. Alexopoulos C, Kritas S, Kyriakis C, Tzika E, Kyriakis S. Sow performance in an endemically porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)-infected farm after sow vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *Vet Microbiol.* 2005;111(3):151-7.
3. Alonso C, Murtaugh MP, Dee SA, Davies PR. Epidemiological study of air filtration systems for preventing PRRSV infection in large sow herds. *Prev Vet Med.* 2013;112(1):109-17.
4. Amadori M, Razzuoli E. Immune control of PRRS: lessons to be learned and possible ways forward. *Frontiers in Veterinary Science.* 2014;1.
5. Batista L. Porcine reproductive and respiratory syndrome diagnostics in the breeding herd: Back to the basics. *J.Swine Health Prod.* 2005;13:96-8.
6. Batista L, Pijoan C, Torremorell M. Experimental injection of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during acclimatization. *Journal of Swine Health and Production.* 2002;10(4):147-52.
7. Batista L, Dee SA, Rossow KD, Deen J, Pijoan C. Assessing the duration of persistence and shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of breeding-age gilts. *Can J Vet Res.* 2002 Jul;66(3):196-200.
8. Batista L, Pijoan C, Dee S, Olin M, Molitor T, Joo HS, et al. Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *Can J Vet Res.* 2004 Oct;68(4):267-73.
9. Bierk M, Dee S, Rossow K, Collins J, Guedes M, Molitor T. Experiences with tonsil biopsy as an ante-mortem diagnostic test for detecting PRRS virus infection in breeding swine. *Journal of Swine Health and Production.* 2001;8(6):279-82.

10. Blaha T. The "colorful" epidemiology of PRRS. *Vet Res.* 2000 Jan-Feb;31(1):77-83.
11. Blanquefort P, Benoit F. Eradication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus in 125 herds in "Pays de la Loire. *Vet Res.* 2000;31(1):94-5.
12. Bøtner A. Diagnosis of PRRS. *Vet Microbiol.* 1997;55(1):295-301.
13. Brockmeier SL, Palmer MV, Bolin SR. Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Bordetella bronchiseptica*, or a combination of both organisms in pigs. *Am J Vet Res.* 2000;61(8):892-9.
14. Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Pijoan C. Impact of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine intervention on a population of pigs infected with a heterologous isolate. *Vaccine.* 2007;25(22):4382-91.
15. Cheon D, Chae C. Distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in stillborn and liveborn piglets from experimentally infected sows. *J Comp Pathol.* 2001;124(4):231-7.
16. Cho JG, Dee SA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology.* 2006;66(3):655-62.
17. Christopher-Hennings J. The pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in the boar. *Vet Res.* 2000;31(1):57-8.
18. Christopher-Hennings J, Faaberg KS, Murtaugh MP, Nelson EA, Roof MB, Vaughn EM, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) diagnostics: Interpretation and limitations. *Journal of Swine Health and Production.* 2002;10(5):213-20.
19. Corzo CA, Mondaca E, Wayne S, Torremorell M, Dee S, Davies P, et al. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 2010;154(1):185-92.
20. Dee S, Molitor T. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus using a test and removal process. . 1998.

21. Dee S, Cano JP, Spronk G, Reicks D, Ruen P, Pitkin A, et al. Evaluation of the long-term effect of air filtration on the occurrence of new PRRSV infections in large breeding herds in swine-dense regions. *Viruses*. 2012;4(5):654-62.
22. Dee S, Otake S, Oliveira S, Deen J. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res*. 2009;40(4):1-13.
23. Domingo-Calap P, Pereira-Gòmez M, Sanjuán R. Selection for thermostability can lead to the emergence of mutational robustness in an RNA virus. *J Evol Biol*. 2010;23(11):2453-60.
24. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 May 1;90(9):4171-5.
25. Drew TW. A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Res*. 2000;31(1):27-39.
26. Drigo M, Franzo G, Gigli A, Martini M, Mondin A, Gracieux P, et al. The impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genetic heterogeneity on molecular assay performances. *J Virol Methods*. 2014;202:79-86.
27. Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(4):267-76.
28. Fahrion A, Grosse Beilage E, Nathues H, Dürr S, Doherr M. Evaluating perspectives for PRRS virus elimination from pig dense areas with a risk factor based herd index. *Prev Vet Med*. 2014;114(3):247-58.
29. Fano E, Olea L, Pijoan C. Eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by serum inoculation of naive gilts. *Can J Vet Res*. 2005 Jan;69(1):71-4.
30. Forsberg R, Storgaard T, Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Cordioli P, Sala G, et al. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. *Virology*. 2002;299(1):38-47.

31. Franzo G, Cecchinato M, Martini M, Ceglie L, Gigli A, Drigo M. Observation of high recombination occurrence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in field condition. *Virus Res.* 2014;194:159-66.
32. Galina L, Pijoan C, Sitjar M, Christianson WT, Rossow K, Collins JE. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet Rec.* 1994 Jan 15;134(3):60-4.
33. Holtkamp DJ, Polson DD, Torremorell M, Morrison B, Classen DM, Becton L, et al. Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. *J Swine Health Prod.* 2011;19(1):45.
34. Holtkamp DJ, Yeske PE, Polson DD, Melody JL, Philips RC. A prospective study evaluating duration of swine breeding herd PRRS virus-free status and its relationship with measured risk. *Prev Vet Med.* 2010;96(3):186-93.
35. Kappes MA, Faaberg KS. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology.* 2015;479:475-86.
36. Karniychuk UU, Geldhof M, Vanhee M, Van Doorselaere J, Saveleva TA, Nauwynck HJ. Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC veterinary research.* 2010;6(1):1.
37. Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JM, Stockhofe-Zurwieden N. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine.* 2009;27(28):3704-18.
38. Kvisgaard LK, Hjulsager CK, Kristensen CS, Lauritsen KT, Larsen LE. Genetic and antigenic characterization of complete genomes of Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome viruses (PRRSV) isolated in Denmark over a period of 10 years. *Virus Res.* 2013;178(2):197-205.
39. Lai MM. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev.* 1992 Mar;56(1):61-79.

40. LaRue RS, Andresdottir V, Blanchard Y, Conticello SG, Derse D, Emerman M, et al. Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. *J Virol*. 2009 Jan;83(2):494-7.
41. Lewis CR, Ait-Ali T, Clapperton M, Archibald AL, Bishop S. Genetic perspectives on host responses to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Viral Immunol*. 2007;20(3):343-58.
42. Li X, Galliher-Beckley A, Nietfeld JC, Faaberg KS, Shi J, Montanide TM. Gel01 ST adjuvant enhances PRRS modified live vaccine efficacy by regulating porcine humoral and cellular immune responses. . 2013.
43. Lopez O, Osorio F. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;102(3):155-63.
44. Lunney JK, Benfield DA, Rowland RR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res*. 2010;154(1):1-6.
45. Lyoo YS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine does not fit in classical vaccinology. *Clinical and experimental vaccine research*. 2015;4(2):159-65.
46. Martelli P, Cordioli P, Alborali LG, Gozio S, De Angelis E, Ferrari L, et al. 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):3400-8.
47. Martinez E, Riera P, Sitja M, Fang Y, Oliveira S, Maldonado J. Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Res Vet Sci*. 2008;85(1):184-93.
48. Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunology. *The Veterinary Journal*. 2008;177(3):345-51.

49. McCaw MB. Effect of reducing crossfostering at birth on piglet mortality and performance during an acute outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Swine Health and Production*. 2000;8(1):15-21.
50. Meier W, Wheeler J, Husmann R, Osorio F, Zuckermann F. Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus. *Vet Res*. 2000;31(1):41-.
51. Mengeling WL, Lager KM. A brief review of procedures and potential problems associated with the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Res*. 2000;31(1):61-9.
52. Molitor T, Bautista E, Choi C. Immunity to PRRSV: double-edged sword. *Vet Microbiol*. 1997;55(1):265-76.
53. Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, et al. 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(3):385-92.
54. Nielsen TL, Nielsen J, Have P, Bækbo P, Hoff-Jørgensen R, Bøtner A. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*. 1997;54(2):101-12.
55. Nodelijk G, Nielen M, De Jong M, Verheijden J. A review of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Dutch breeding herds: population dynamics and clinical relevance. *Prev Vet Med*. 2003;60(1):37-52.
56. Oleksiewicz M, Bøtner A, Madsen KG, 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(1):7-22.
57. Otake S, Dee SA, Rossow KD, Deen J, Joo HS, Molitor TW, et al. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). *Journal of Swine Health and Production*. 2002;10(2):59-66.

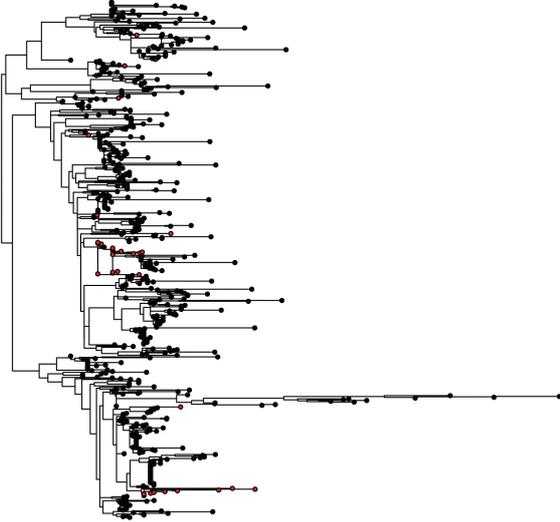
58. Otake S, Dee SA, Rossow KD, Moon RD, Pijoan C. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2002;66(3):191-5.
59. Otake S, Dee S, Corzo C, Oliveira S, Deen J. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet Microbiol*. 2010;145(3):198-208.
60. Pesch S, Meyer C, Ohlinger V. New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol*. 2005;107(1):31-48.
61. Pesente P, Rebonato V, Sandri G, Giovanardi D, Ruffoni LS, Torriani S. Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: a showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. *Vet Microbiol*. 2006;114(3):214-24.
62. Polson D, Hartsook G, Dion K. McRebel as a key component for the successful elimination of PRRS virus from very large swine breeding herds. *Int Pig Vet Soc Cong.Pg*. 2010;267.
63. Prieto C, Castro J. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in gestating sows. *Vet Res*. 2000;31(1):56-7.
64. Prieto C, Álvarez E, Martínez-Lobo FJ, Simarro I, Castro JM. Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred. *The Veterinary Journal*. 2008;175(3):356-63.
65. Prieto C, Vázquez A, Núñez JI, Álvarez E, Simarro I, Castro JM. Influence of time on the genetic heterogeneity of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *The Veterinary Journal*. 2009;180(3):363-70.
66. Qiao S, Feng L, Bao D, Guo J, Wan B, Xiao Z, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin act in synergy to amplify the inflammatory response of infected macrophages. *Vet Microbiol*. 2011;149(1):213-20.

67. Reicks D, Yeske P, Rossow K, Murtaugh M, Torrison J. The effect of killed and/or MLV vaccination on exposure to late term pregnant gilts. Allen D. Leman Swine Conference Proceedings; ; 2010.
68. Scotti M, Prieto C, Simarro I, Castro JM. Reproductive performance of gilts following vaccination and subsequent heterologous challenge with European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*. 2006;66(8):1884-93.
69. Shi M, Lam TT, Hon C, Hui RK, Faaberg KS, Wennblom T, et al. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res*. 2010;154(1):7-17.
70. Shi M, Lemey P, Brar MS, Suchard MA, Murtaugh MP, Carman S, et al. The spread of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in North America: a phylogeographic approach. *Virology*. 2013;447(1):146-54.
71. Snijder EJ, Kikkert M, Fang Y. Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *J Gen Virol*. 2013;94(10):2141-63.
72. Stadejek T, Oleksiewicz M, Potapchuk D, Podgorska K. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol*. 2006;87(7):1835-41.
73. Stadejek T, Stankevicius A, Storgaard T, Oleksiewicz MB, Belak S, Drew T, et al. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J Gen Virol*. 2002;83(8):1861-73.
74. Stadejek T, Oleksiewicz MB, Scherbakov AV, Timina AM, Krabbe JS, Chabros K, et al. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch Virol*. 2008;153(8):1479-88.
75. Stadejek T, Stankevicius A, Murtaugh MP, Oleksiewicz MB. Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. *Vet Microbiol*. 2013;165(1):21-8.

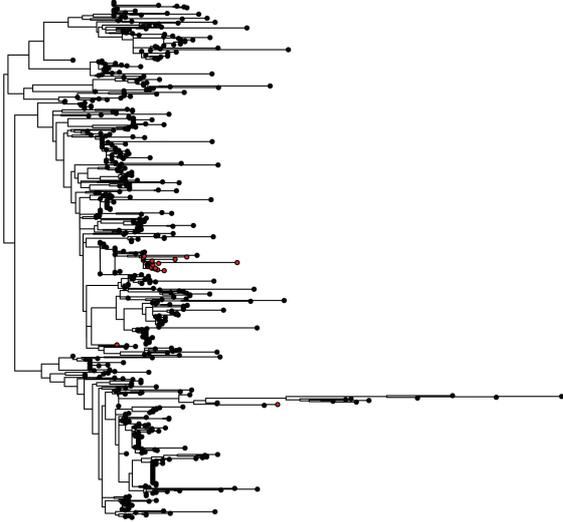
76. Stevenson G, Van Alstine W, Kanitz C, Keffaber K. Journal of Veterinary Diagnostic. J Vet Diagn Invest. 1993;5:432-4.
77. Suárez P. Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. Vet Res. 2000;31(1):47-55.
78. Sun Y, Han M, Kim C, Calvert JG, Yoo D. Interplay between interferon-mediated innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Viruses. 2012;4(4):424-46.
79. Sur JH, Doster AR, Christian JS, Galeota JA, Wills RW, Zimmerman JJ, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. J Virol. 1997 Dec;71(12):9170-9.
80. Thacker EL, Thacker BJ, Young TF, Halbur PG. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vaccine. 2000;18(13):1244-52.
81. Thanawongnuwech R, Suradhat S. Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design. Virus Res. 2010;154(1):133-40.
82. Toplak I, Štukelj M, Gracieux P, Gyula B, Larsen LE, Rauh R. Detection of PRRSV in 218 field samples using six molecular methods: What we are looking for? 3rd EuroPRRSnet conference on Understanding and Combatting PRRS in Europe; ; 2012.
83. Torremorell M, Rojas M, Cuevas L, De La Carrera F, Lorenzo F, Osorio F, et al. National PRRSV eradication program in Chile. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa; ; 2008.
84. Van Reeth K. Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet Microbiol. 1997;55(1):223-30.
85. 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(3):325-35.

86. van Vugt JJ, Storgaard T, Oleksiewicz MB, Bøtner A. High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity. *J Gen Virol.* 2001;82(11):2615-20.
87. Vashisht K, Erlandson KR, Firkins LD, Zuckermann FA, Goldberg TL. Evaluation of contact exposure as a method for acclimatizing growing pigs to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Am Vet Med Assoc.* 2008;232(10):1530-5.
88. Veit M, Matczuk AK, Sinhadri BC, Krause E, Thaa B. Membrane proteins of arterivirus particles: structure, topology, processing and function. *Virus Res.* 2014;194:16-36.
89. Wills R, Zimmerman J, Yoon K, Swenson S, McGinley M, Hill H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol.* 1997;55(1):231-40.
90. Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):58-62.
91. Yaeger MJ, Prieve T, Collins J, Christopher-Hennings J, Nelson E, Benfield D. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health Prod.* 1993;1(5):7-9.
92. Zimmerman J, Benfield D, Murtaugh M, Osorio F, Stevenson G, Torremorell M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus). *Diseases of swine.* 2006;9:387-418.
93. Zuckermann FA, Garcia EA, Luque ID, Christopher-Hennings J, Doster A, Brito M, et al. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet Microbiol.* 2007;123(1):69-85.

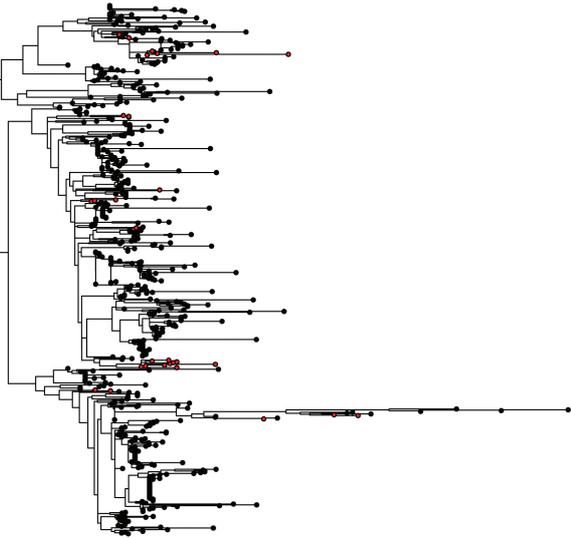
# Appendice



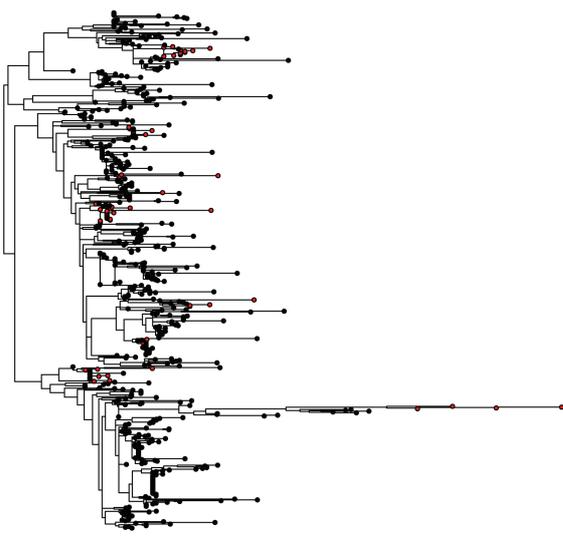
Filiera 1



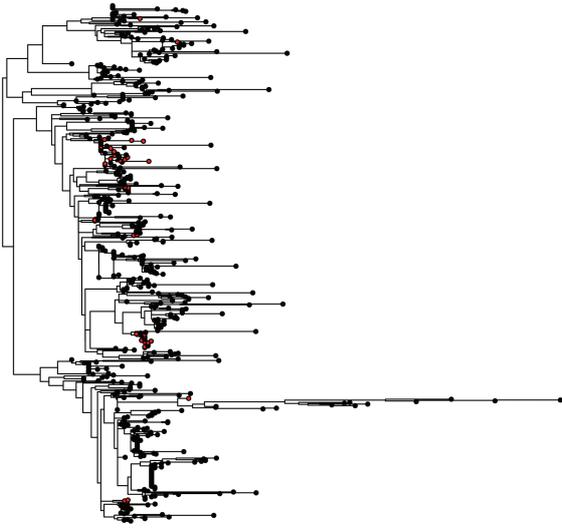
Filiera 11



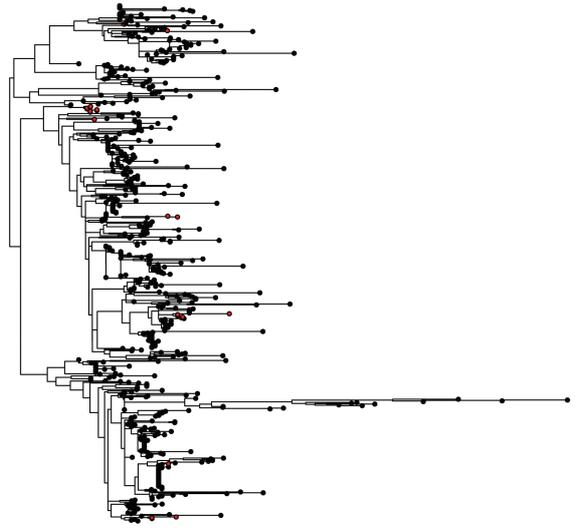
Filiera 3



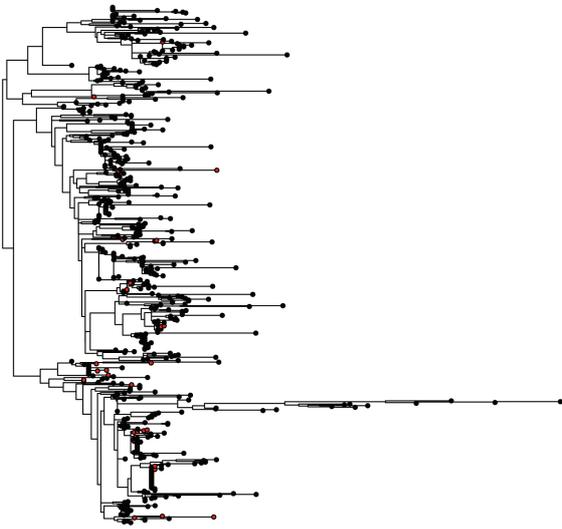
Filiera 6



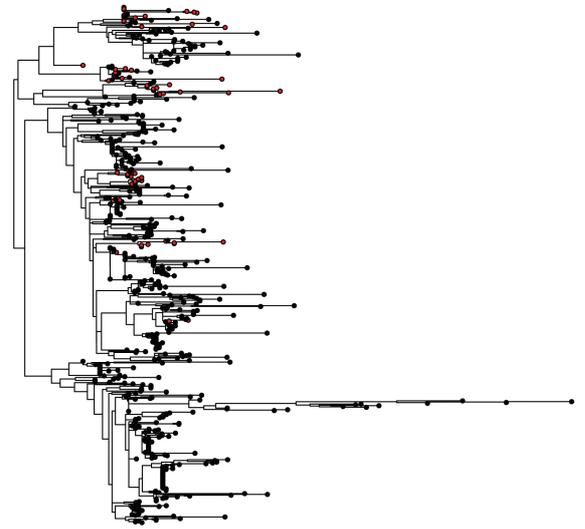
Filiera 22



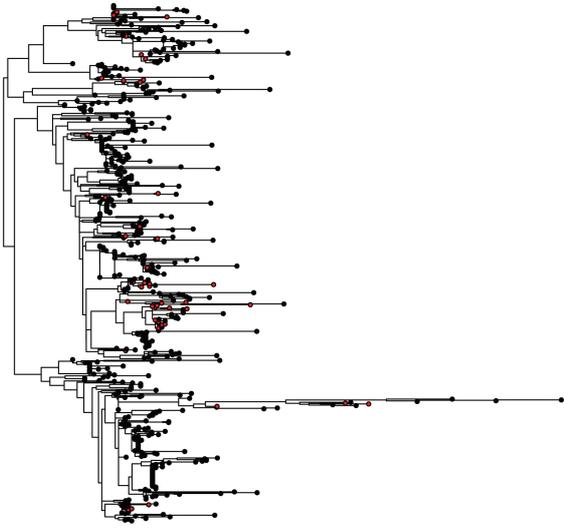
Filiera 23



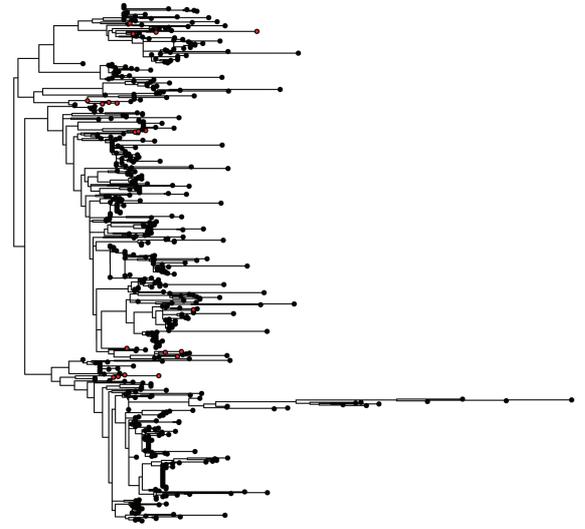
Filiera 15



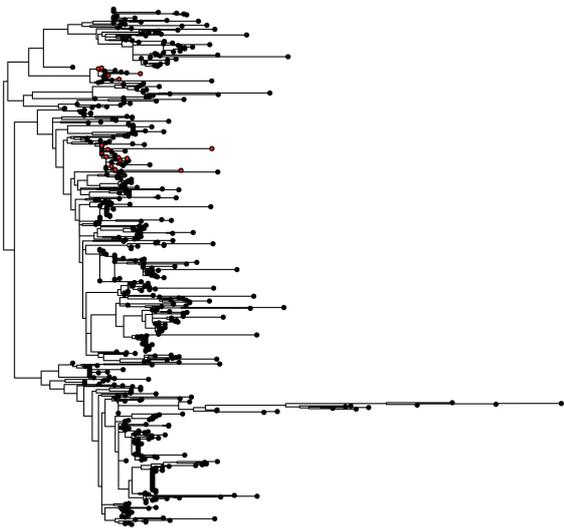
Filiera 27



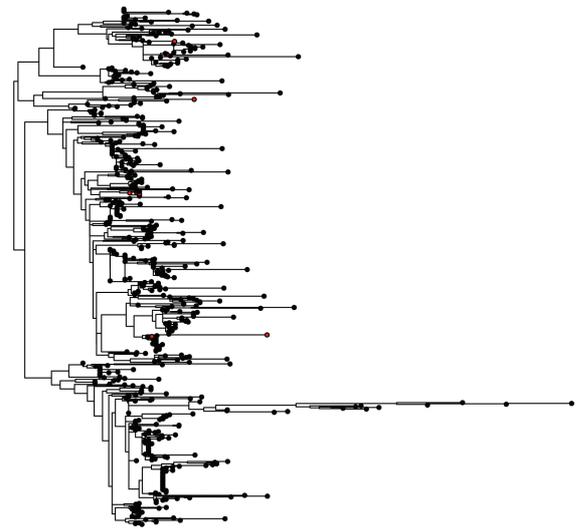
Filiera 19



Filiera 30

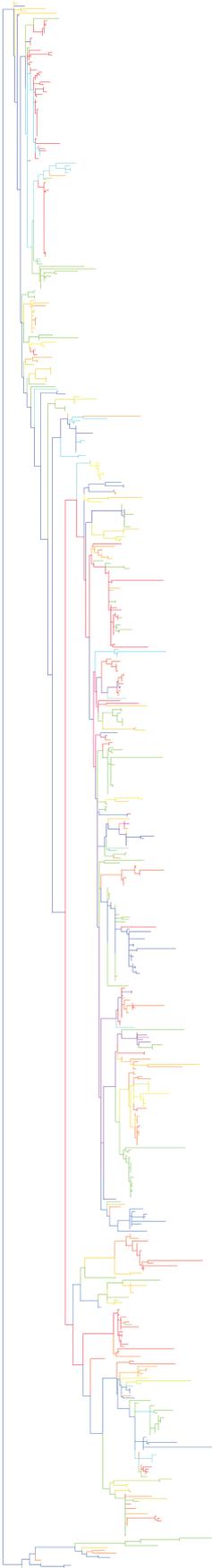


Filiera 32



Filiera 31

# Albero filogenetico aziendale



## Alberi filogenetici per singola filiera

