



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesi doctoral

Avaluació de l'eficiència de l'ús dels fluids orals en el diagnòstic del PRRSV

Elisa Gibert Rebull

**Doctorat en Medicina i Sanitat Animals
Departament de Sanitat i Anatomia Animals**

2017

CReSA
Centre de Recerca en Sanitat Animal

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

IRTA
RECERCA | I | TECNOLOGIA
AGROALIMENTÀRIES

Avaluació de l'eficiència de l'ús dels fluids orals en el diagnòstic del PRRSV

Tesi doctoral presentada per l'**Elisa Gibert Rebull** per accedir al grau de Doctora en Veterinària dins del programa de Doctorat en Medicina i Sanitat Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. Enric M. Mateu de Antonio.

Bellaterra, 2017



FACULTAT DE VETERINÀRIA

Enric M. Mateu de Antonio, professor titular del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària i investigador adscrit a l'IRTA

Declara:

Que la memòria titulada: **“Avaluació de l'eficiència de l'ús dels fluids orals en el diagnòstic del PRRSV”**, presentada per l'**Elisa Gibert Rebull** per a l'obtenció del grau de Doctora en Veterinària, s'ha realitzat sota la meva direcció en el programa de doctorat de Medicina i Sanitat Animals, del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, opció Sanitat Animal.

I perquè consti als efectes oportuns, signo la present declaració a Bellaterra, 10 de Febrer del 2017:

Dr. Enric M. Mateu

Elisa Gibert Rebull

Director

Doctoranda

Els estudis de doctorat de l'Elisa Gibert Rebull han estat finançats amb una beca predoctoral del *Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias* (INIA).

Part del present treball ha estat finançat pels projectes RTA2011-0119-C01-00 de l'INIA i FEDER.

La impressió d'aquesta tesi ha estat finançada pel *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (CReSA) i l'*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries* (IRTA).

TAULA DE CONTINGUTS

LLISTAT D'ABREVIACIONS	III
RESUM.....	V
RESUMEN	VIII
SUMMARY	XI
PUBLICACIONS	XV
INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1. BREU HISTÒRIA DEL VIRUS DE LA SÍNDROME REPRODUCTIVA I RESPIRATÒRIA PORCINA	1
2. AGENT ETIOLÒGIC	2
2.1 Taxonomia, organització genòmica i estructura vírica	2
2.2 Cèl·lules diana, entrada del virus en les cèl·lules hoste i replicació	5
2.3 Origen i evolució del PRRSV	6
3. SIGNES CLÍNICS	8
4. PATOGÈNIA.....	8
5. IMMUNITAT	10
5.1 Immunitat innata	10
5.2 Immunitat adquirida	11
6. EPIDEMIOLOGIA.....	15
6.1 Transmissió vertical.....	15
6.2 Transmissió horitzontal.....	16
6.3 Dinàmica de la infecció del PRRSV en una granja.....	19
7. DIAGNÒSTIC.....	20
7.1 Aïllament víric	21
7.2 RT-PCR, transcripció inversa i reacció en cadena de la polimerasa	21
7.3 Serologia	24
8. CONTROL DEL PRRSV	25
8.1 Bioseguretat.....	26
8.2 Diagnòstic i monitoratge	27
8.3 Maneig	29
8.4 Estat immunitari.....	31
9. ELS FLUIDS ORALS.....	33
9.1 Composició dels fluids orals	33
9.2 L'ús dels fluids orals com a eina diagnòstica	34
9.3 Els fluids orals en el diagnòstic del PRRSV	35
9.4 Límits dels FO	36
BIBLIOGRAFIA INTRODUCCIÓ.....	47
HIPÒTESI I OBJECTIUS	73
ESTUDI 1: PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) SHEDDING IN ORAL FLUIDS OF NAÏVE AND VACCINATED PIGS EXPOSED TO THE WILD-TYPE GENOTYPE 1 VIRUS.	77
1. INTRODUCTION.....	79
2. MATERIALS AND METHODS	79
2.1 Ethics statement	80
2.2 Animals, housing, and oral fluid collection.....	80

2.3 Collection and processing of samples	81
2.4 PRRSV RNA extraction and detection via qRT-PCR.....	82
2.5 Statistical analysis	82
3. RESULTS.....	83
3.1 Dynamics of PRRSV OF shedding	83
3.2 Comparison of OF shedding versus viremia	87
3.3 Oral fluid volume	89
4. DISCUSSION	89
5. ACKNOWLEDGEMENTS	90
6. APPENDIX.....	90
7. REFERENCES.....	91
ESTUDI 2: COMPARISON OF PROTOCOLS FOR THE ANALYSIS OF TYPE 1 PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS BY RT-PCR USING ORAL FLUIDS.....	93
1. INTRODUCTION.....	95
2. MATERIALS AND METHODS	96
2.1 Oral fluid and virus used	96
2.2 Evaluation of different matrices for collecting OF and effect of storage conditions.....	96
2.3 Centrifugation conditions and storage time	97
2.4 Comparison of RNA extraction methods and commercial mixes for qRT-PCR.....	98
2.5 Statistical methods	99
3. RESULTS.....	99
3.1 Evaluation of different matrices for collecting OF and effect of storage condition	99
3.2 Centrifugation conditions and storage time	100
3.3 Comparison of RNA extraction methods and commercial mixes for RT-PCR.....	101
4. DISCUSSION	105
5. CONCLUSIONS	107
6. CONFLICT OF INTEREST STATEMENT	107
7. ACKNOWLEDGEMENTS	107
8. REFERENCES.....	108
ESTUDI 3: DEVELOPMENT OF A MODEL FOR EVALUATION OF THE USE OF ORAL FLUIDS FOR THE MONITORING OF PRRSV IN NURSERIES IN QUASI-STABILIZED HERDS.....	111
1. INTRODUCTION.....	113
2. MATERIALS AND METHODS	114
2.1 Herd structure	114
2.2 Variables and parameters	115
2.3 Model building.....	117
3. RESULTS.....	119
4. DISCUSSION	124
5. ACKNOWLEDGEMENTS	125
6. REFERENCES.....	126
DISCUSSIÓ GENERAL.....	129
BIBLIOGRAFIA DISCUSSIÓ.....	139
CONCLUSIONS	141
ANNEX	143
1. ALTRES PUBLICACIONS	143
2. APORTACIONS A CONGRESSOS INTERNACIONALS.....	143

LLISTAT D'ABREVIACIONS

ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i>
AN	Anticossos neutralitzants
ANN	Anticossos no neutralitzants
APP	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
BMDC	Cèl·lules derivades de la medul·la òssia
CD	Cèl·lules dendrítiques
CPA	Cèl·lules presentadores d'antigen
CP-IFN- γ	Cèl·lules productores d'interferó gamma
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DI ₅₀	Dosi infectiva al 50%
DIM	Dosi infectiva mínima
DNA	Àcid desoxiribonucleic
EAV	<i>Virus de l'arteritis equina</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration (EUA)</i>
FelV	<i>Virus de la leucèmia felina</i>
FIV	<i>Virus de la immunodeficiència felina</i>
FO	Fluids orals
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFI	Immunofluorescència indirecta
IFN I	Interferó tipus I
Ig	Immunoglobulina
IL-10	Interleuquina-10
IPMA	Immunoperoxidasa en monocapa
LDV	<i>Virus elevador de la lactat-deshidrogenasa dels ratolins</i>
MAP	Macròfags alveolars de porcíns

MLV	<i>Modified live vaccine</i>
nsp	Proteïna no estructural
ORF	Marc obert de lectura
PCV2	<i>Porcine circovirus type 2</i>
PI	Postinfecció
pp	Poliproteïna
PPC	Pesta porcina clàssica
PRRSV	<i>Porcine reproductive respiratory syndrome virus</i>
RNA	Àcid ribonucleic
RT-PCR	Transcripció inversa i reacció en cadena de la polimerasa
SHFV	<i>Virus de la febre hemorràgica dels simis</i>
SN	Seroneutralització
TCID ₅₀	Dosi infectiva de cultiu tissular al 50%
TGEV	<i>Virus de la gastroenteritis transmissible porcina</i>
TNF- α	Factor de necrosi tumoral
VA	Vacuna atenuada
VDL	<i>Veterinary Diagnostic Laboratory</i>
VDPAM	<i>Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine</i>
VI	Vacuna inactivada
VIH	<i>Virus de la immunodeficiència humana</i>

RESUM

En els darrers anys, l'ús dels fluids orals (FO) com a mostra diagnòstica en el control i monitoratge del *Virus de la síndrome reproductiva i respiratòria porcina* (PRRSV) s'ha estès en gran mesura per l'Amèrica del Nord i de manera més discreta per Europa. Tanmateix, no existeixen gaires estudis sobre els límits de detecció de la tècnica en el monitoratge de la malaltia en granges infectades amb el PRRSV1. Per aquesta raó l'objectiu de la present tesi va ser avaluar l'eficiència de l'ús dels fluids orals en el diagnòstic del PRRSV1, determinant els factors que influeixen en la seva eficàcia diagnòstica. La tesi es va organitzar en 3 estudis.

L'objectiu del primer estudi va ser l'avaluació de l'excreció individual en FO del PRRSV1 al llarg del temps, en animals inoculats, infectats per contacte i infectats vacunats. Paral·lelament, es va valorar la sensibilitat de l'excreció del virus en els FO prenent com a referència la virèmia. Quaranta garrins de 3 setmanes d'edat es van dividir en dos grups, 14 van ser vacunats (V) i 26 es van deixar sense vacunar (NV). Trenta dies més tard 20 animals NV van ser inoculats amb la soca CReSA 3267 del PRRSV1 i es van anomenar animals llavor (S). Dos dies més tard cada S va ser allotjat amb una parella, o bé amb un NV (n=6) o bé amb un V (n=14). Es van prendre mostres de sèrum i FO individuals els dies 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24 i 26 posteriors a la introducció dels animals S. En els animals V es va arribar fins els 31 dies de mostreig. Tan les mostres de sèrum com de FO van ser analitzades per PCR quantitativa. Els animals S i NV van mostrar un patró d'excreció en FO semblant, en canvi el patró dels animals vacunats va ser més inconstant. El període mig d'excreció del virus en FO va ser de 23.50 dies (± 2.63) en S, 18.00 dies (± 3.40) en NV y de 12.36 dies (± 6.95) en V, resultant en aquest últim cas en una reducció significativa del període d'excreció ($P < 0.05$). Pel que fa al rang de càrrega viral en FO va ser de 2.48-4.10 \log_{10} equivalents genòmics/mL en S, 2.58-4.20 en NV i de 2.26-3.48 en V. Els valors Kappa entre els FO i el sèrum van ser 0.86 (IC_{95%}: 0.73-0.99) en S, 0.88 (IC_{95%}: 0.64-1.00) en NV y 0.68 (IC_{95%}: 0.59-0.83) en V.

L'objectiu del segon estudi era identificar i valorar les pèrdues d'eficiència que es podrien donar durant el procés d'anàlisi de les mostres de FO per qRT-PCR: efecte de les diferents matrius per la recollida de les mostres, el temps i la temperatura fins a la seva anàlisi, les condicions de conservació, l'efecte de la centrifugació, de diferents mètodes d'extracció de l'RNA i dels reactius per la PCR. Es van recollir FO en corrals de transicions de granges comercials lliures de PRRSV que es van infectar amb la mateixa soca del PRRSV1 utilitzada en l'estudi anterior. A partir d'aquí es van construir bancs de dilucions decimals, des de 10^5 o 10^4 a 10^0 TCID₅₀/mL, tants com van ser necessaris en cada fase de l'estudi. Totes les mostres es van analitzar per qRT-PCR. En un primer experiment es van avaluar tres tipus de matrius diferents, cordes, gasa i Salivette®. Aquests materials es van amagar amb les diferents dilucions decimals creant nou rèpliques de cada dilució per a cada material. Posteriorment tres rèpliques es van analitzar immediatament, tres es van deixar a 4°C durant 24h i la resta es van congelar a -80°C. En una segona fase les dilucions decimals es van dividir en tres grups, un es va analitzar immediatament i els altres dos es van mantenir a 4°C, el primer durant 24h i el segon durant 72h. En el moment de la seva anàlisi cada grup es va subdividir en tres. En un les mostres es van centrifugar a 15.000 g durant 15 min, en l'altre a 1.000 g durant 10 minuts i l'últim grup de mostres no es va centrifugar. Posteriorment, per una avaluació més precisa de l'impacte de la centrifugació es van infectar 30 FO amb 10^1 TCID₅₀/mL i 30 amb 10^0 TCID₅₀/mL. La meitat de les rèpliques de cada grup es van centrifugar a 15.000 g durant 15 minuts i la resta es van utilitzar com a control. En un últim estudi es van comparar sis kits d'extracció d'RNA diferents, tres basats en la separació d'àcids nucleics utilitzant columnes de sílice, dos basats en l'efecte de les boles magnètiques i el mètode del TRIzol®, que es va prendre com a referència. Paral·lelament es van posar a prova dos tipus de reactius per la qRT-PCR. Per mesurar el rendiment de cada protocol es va utilitzar l'eficiència de la qRT-PCR obtinguda en les diferents combinacions. No es van trobar diferències entre les matrius de recollida ni els mètodes de conservació dels FO. En canvi, es va observar una menor sensibilitat analítica ($P < 0.05$) en les mostres mantingudes durant 72h a 4°C. En les dilucions límit, la centrifugació a 15.000 g va produir un

augment significatiu en la sensibilitat de les mostres ($P < 0.05$). Els mètodes d'extracció amb majors eficiències van ser el TRIzol[®], el MagMAX[™] i el NuceoSpin[®]. En dilucions de FO iguals, el *kit* de qRT-PCR LSI VetMAX[®] va donar menors Cts que l'AgPath[™].

En el tercer estudi, a partir de la bibliografia existent i les dades obtingudes en els experiments anteriors, es va elaborar un càlcul de probabilitats per determinar els límits de la detecció del PRRSV1 en FO quan s'usa en granges amb baixes prevalences. Es van comparar diversos tipus de granges d'acord amb l'estructura de les maternitats, de les transicions i la mida del mostreig. Segons els resultats obtinguts, els factors determinants de la detecció del PRRSV van ser la incidència dels esdeveniments verticals, el nombre de truges en producció, la mida dels corrals de transició, així com el nombre de corrals analitzats. La qRT-PCR va ser capaç de detectar el virus en els FO en la majoria d'escenaris possibles, fins i tot quan es tenia un sol animal infectat en corrals de 50 o menys animals. Els principals factors limitants van ser la proporció de parts amb naixement de garrins virèmics i la distribució dels animals que sortien infectats des de les maternitats cap a les transicions. En la majoria de casos, incidències de parts amb animals virèmics inferiors al 5% en granges de 1.000 o menys truges, feien que la presència d'animals infectats en els corrals de transició fos un fenomen rar, i la seva detecció depengués més del nombre de corrals mostrejats que de qualsevol altra circumstància.

Com a conclusió, els resultats de la present tesi estableixen un protocol on es maximitza la sensibilitat en la detecció del PRRSV1 en FO. Així mateix, també demostren que, seguint aquestes pautes, els FO són una bona eina diagnòstica per a la detecció de la circulació vírica en transicions encara que la prevalença de la malaltia sigui mínima.

RESUMEN

En los últimos años, el uso de los fluidos orales (FO) como muestra diagnóstica en el control y monitorización del *Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino* (PRRSV) se ha extendido en gran medida por América del Norte y de manera más discreta por Europa. Sin embargo, pocos son los estudios que se han llevado a cabo acerca de los límites de detección de la técnica en la monitorización de la enfermedad en granjas infectadas con el PRRSV1. Por ello el objetivo de la presente tesis fue evaluar la eficiencia del uso de los fluidos orales en el diagnóstico del PRRSV1, determinando los factores que influyen en su eficacia diagnóstica. La tesis se organizó en 3 estudios.

El objetivo del primer estudio era la evaluación de la excreción individual en FO del PRRSV1 a lo largo del tiempo, en animales inoculados, infectados por contacto e infectados vacunados. Paralelamente, se valoró la sensibilidad de la excreción del virus en los FO tomando como referencia la viremia. Cuarenta lechones de 3 semanas de edad se dividieron en dos grupos, 14 se vacunaron (V) y 26 se dejaron sin vacunar (NV). Treinta días más tarde 20 animales NV fueron inoculados con la cepa CReSA 3267 del PRRSV1 y se designaron como animales semilla (S). Dos días más tarde cada S fue alojado con una pareja, o bien con un NV (n=6) o bien con un V (n=14). Se tomaron muestras de suero y FO individuales los días 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24 y 26 posteriores a la introducción de los animales S. En los animales V se llegó hasta los 31 días de muestreo. Tanto las muestras de suero como de FO se analizaron por PCR cuantitativa. Los animales S y NV mostraron un patrón de excreción en FO parecido, en cambio el patrón de los animales vacunados fue más inconstante. El período medio de excreción del virus en FO fue de 23.50 días (± 2.63) en S, 18.00 días (± 3.40) en NV y de 12.36 días (± 6.95) en V, produciéndose en este último caso una reducción significativa del período de excreción ($P < 0.05$). Por lo que al rango de carga viral en FO se refiere, fue de 2.48-4.10 \log_{10} equivalentes genómicos/mL en S, 2.58-4.20 en NV y de 2.26-3.48 en V. Los valores Kappa entre los FO y el suero fueron 0.86 (IC_{95%}: 0.73-0.99) en S, 0.88 (IC_{95%}: 0.64-1.00) en NV y 0.68 (IC_{95%}: 0.59-0.83) en V.

El objetivo del segundo estudio era identificar y valorar las pérdidas de eficiencia que podrían darse durante el proceso de análisis de las muestras de FO por qRT-PCR: efecto de las diferentes matrices para la recogida de las muestras, el tiempo y la temperatura hasta su análisis, las condiciones de conservación, el efecto de la centrifugación, de diferentes métodos de extracción del RNA y de los reactivos para la PCR. Se recogieron FO en corrales de transiciones de granjas comerciales libres del PRRSV que se infectaron con la misma cepa del PRRSV1 utilizada en el estudio anterior. A partir de aquí se construyeron bancos de diluciones decimales, desde 10^5 o 10^4 a 10^0 TCID₅₀/mL, tantos como fueron necesarios en cada fase del estudio. Todas las muestras se analizaron por qRT-PCR. En un primer experimento se evaluaron tres tipos de matrices diferentes, cuerdas, compresas y Salivette®. Estos materiales fueron empapados con las diferentes diluciones decimales creando nueve réplicas de cada dilución para cada material. Posteriormente tres réplicas fueron analizadas inmediatamente, tres se dejaron a 4°C durante 24h y el resto se congelaron a -80°C. En una segunda fase las diluciones decimales se dividieron en tres grupos, uno se analizó inmediatamente y los otros dos se mantuvieron a 4°C, el primero durante 24h y el segundo durante 72h. En el momento de su análisis cada grupo se subdividió en tres. En uno las muestras se centrifugaron a 15.000 g durante 15 min, en el otro a 1.000 g durante 10 minutos y el último grupo de muestras no se centrifugó. Posteriormente, para una evaluación más precisa del impacto de la centrifugación se infectaron 30 FO con 10^1 TCID₅₀/mL y 30 con 10^0 TCID₅₀/mL. La mitad de las réplicas de cada grupo se centrifugaron a 15.000 g durante 15 minutos y el resto se utilizaron como control. En un último estudio se compararon seis *kits* de extracción de RNA diferentes, tres basados en la separación de ácidos nucleicos utilizando columnas de sílice, dos basados en el efecto de las bolas magnéticas y el método del TRIzol®, que se tomó como referencia. Paralelamente se probaron dos tipos de reactivos para la qRT-PCR. Para medir el rendimiento de cada protocolo se utilizó la eficiencia de la qRT-PCR obtenida en las diferentes combinaciones. No se encontraron diferencias entre las matrices de recolección ni los métodos de conservación de los FO. En cambio, sí se observó una menor sensibilidad analítica ($P < 0.05$) en las muestras mantenidas durante 72h a

4°C. En las diluciones límite, la centrifugación a 15.000 g produjo un incremento significativo en la sensibilidad de las muestras ($P < 0.05$). Los métodos de extracción con mayores eficiencias fueron el TRIzol®, el MagMAX™ y el NucleoSpin®. A igual dilución de FO, el *kit* de qRT-PCR LSI VetMAX® dio menores Cts que el AgPath™.

En el tercer estudio, a partir de la bibliografía existente y de los datos obtenidos en los anteriores experimentos, se elaboró un cálculo de probabilidades para determinar los límites de la detección del PRRSV1 en FO cuando se usa en granjas con bajas prevalencias. Se compararon diversos tipos de granjas según la estructura de las maternidades, de las transiciones y el tamaño del muestreo. En los resultados obtenidos, los factores determinantes de la detección del PRRSV fueron la incidencia de los eventos verticales, el tamaño del hato reproductor y de los corrales en transición, así como el número de corrales analizados. La qRT-PCR fue capaz de detectar el virus en FO en la mayoría de escenarios posibles, incluso cuando había un solo animal infectado en corrales de 50 o menos animales. Los principales factores limitantes fueron la proporción de partos con nacimiento de lechones virémicos y la distribución de los animales que salían infectados desde las maternidades hacia las transiciones. En la mayoría de casos, incidencias de partos con animales virémicos inferiores al 5% en granjas de 1.000 o menos cerdas causaban que la presencia de animales infectados en los corrales de transición fuese un fenómeno raro, y su detección dependiera más del número de corrales muestreados que de cualquier otra circunstancia.

En conclusión, los resultados de la presente tesis establecen un protocolo donde se maximiza la sensibilidad para la detección del PRRSV1 en FO. Asimismo, también demuestran que, siguiendo estas pautas, los FO son una buena herramienta diagnóstica para la detección de la circulación vírica en transiciones aunque las prevalencias de la enfermedad sean mínimas.

SUMMARY

In recent years, the use of oral fluids (OF) for the diagnosis and monitoring of *Porcine respiratory and reproductive syndrome virus* (PRRSV) has increased popularity in North America while in Europe its use is still scarce. Few studies have been conducted on the performance of diagnostic techniques for PRRSV1 using OF. The general objective goal of the present thesis was to evaluate the efficiency of the use of OF in the diagnosis of PRRSV1, determining the factors influencing their diagnostic performance. The thesis is organized in 3 studies.

The first one is aimed at evaluating at an individual level, shedding of PRRSV1 in OF over time of pigs inoculated experimentally and in naïve and vaccinated animals infected by contact with inoculated pigs. In addition, the agreement between virus shedded in OF and viremia was also assessed. With this aim, 40 three-week-old piglets were divided into two groups: V (n=14) and NV (n=26). V pigs were vaccinated with a modified live PRRSV vaccine while NV were left as unvaccinated controls. Thirty days later, 20 NV were inoculated with a PRRSV1 isolate (3267) and were used as seeders (S) for other NV (n = 6) or V (n= 14) pigs with which were comingled in a 1:1 basis. Serum samples and individual OF were taken at days 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24, 26 (all) and 31 (only V) after contacting with S animals. Both, sera and OF were analyzed by means of quantitative RT-PCR. S and NV pigs showed a similar pattern of shedding of PRRSV in OF while V showed a more variable and irregular pattern. The average period of shedding in OF was 23.5 days (± 2.63) for S, 18.0 days (± 3.40) for NV and 12.36 days (± 6.95) for V, the latter being significantly shorter ($P < 0.05$) compared to the others. The range of viral loads in OF was 2.48-4.10 \log_{10} genomic equivalents/mL for S, 2.58-4.20 for NV and 2.26-3.48 for V. Kappa values for the comparison of blood and OF were 0.86 (CI_{95%}: 0.73-0.99) for S, 0.88 (CI_{95%}: 0.64-1.00) for NV and 0.68 (CI_{95%}: 0.59-0.83) for V.

The purpose of the second study was to identify and assess the losses of efficiency during the process of analysis of OF samples: the effect of different matrices for collecting the samples, different times and temperatures until the analysis,

conditions of storage, the effect of centrifugation and different PCR reagents and RNA extraction methods. OF collected from weaners of PRRSV-free commercial farms were spiked with PRRSV1 isolate 3267. Decimal dilutions were made, from 10^5 or 10^4 to 10^0 TCID₅₀/mL, and used in different trials. All samples were analysed by qRT-PCR. Firstly, cotton ropes, cotton compresses and commercial Salivette® devices for collecting OF were evaluated. Those materials were soaked into OF containing different concentrations of virus (nine replicas per dilution and material). Three replicas were analysed immediately, three were left at 4°C for 24h and the other three were frozen at -80°C. In a second phase of the experiment, similar virus dilutions were examined after storage for 24h at 4°C, 4°C for 72h and were compared with samples examined immediately after spiking. Samples were also subjected to centrifugation at 15,000 g for 15 min; 1,000 g for 10 min or were tested without previous centrifugation. For a more accurate assessment of the impact of centrifugation, 30 OF samples spiked with 10^1 TCID₅₀/mL and 30 samples spiked with 10^0 TCID₅₀/mL were also examined. Half of the samples were centrifuged at 15,000 g for 15 min and the other half were kept as uncentrifuged controls. In the last trial of this study, six different RNA extraction kits were compared, three of them were based on a silica column separation, two were based on the use of magnetic beads and the sixth method used the TRIZOL® reagent, which was taken as a reference. Two different mixes of reagents for qRT-PCR were also tested. The diagnostic efficiency of each combination was evaluated using spiked OF as above. There were no differences between the results obtained with the different collection matrices or conservation methods. Regarding storage, a significant loss of analytic sensitivity ($P < 0.05$) was observed when OF were stored for 72h at 4°C. Centrifugation at 15,000 g increased significantly ($P < 0.05$) the sensitivity for samples containing 10^0 TCID₅₀/mL. The RNA extraction methods that resulted in the best efficiencies were TRIZOL®, MagMAX™ and NucleoSpin®. At similar dilutions, the LSI VetMAX® produced less Ct for the detection of the virus in OF than AgPath™.

In the third study, based on the existing literature and data obtained in previous experiments, we calculated the probability of detecting PRRSV1 when pen-based OF

were used for monitoring by qRT-PCR in low prevalence farms. Different types of farms were compared according their farrowing and nursery structure, and the size of sampling. Regarding the results obtained, the most decisive factors influencing the detection of PRRSV were the incidence of vertical events, the size of the reproductive herd and the pens for weaners; and the number of pens examined. The qRT-PCR would be able to detect PRRSV in OF in most scenarios even when there was only one infected animal out of 50 penmates. The main factors which limited the detection of PRRSV were the proportion of viremic farrows and the distribution of infected animals from the farrowing units to the nurseries. In most cases, in farms with $\leq 1,000$ sows and less than 5% of PRRSV1 incidence, the presence of infected animals in nursery pens were a rare event and the most important factor was the number of pens sampled.

In conclusion, the results of the present thesis establish a protocol for optimising the sensitivity of PRRSV1 detection in OF samples. Taking into account these recommendations, OF are a good diagnostic tool for the detection of virus circulation in nurseries because PRRSV is detected even in the worst scenarios.

PUBLICACIONES

Els resultants de la present tesi han estat publicats o enviats per publicar en les següents revistes científiques internacionals:

Gibert E., Martín-Valls G.E., Mateu E. Comparison of protocols for the analysis of type 1 *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* by RT-PCR using oral fluids. *J Virol Methods*, doi: 10.1016/j.jviromet.2017.02.010.

Pileri E., Gibert E., Martín-Valls G.E., Nofrarias M., López-Soria S., Martín M., Díaz I., Darwich L., Mateu E. 2017. Transmission of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* to and from genotype 1-vaccinated pigs in a one-to-one model. *Vet. Microbiol.* 201, 18-25.

PART I :

INTRODUCCIÓ GENERAL I OBJECTIUS

INTRODUCCIÓ GENERAL

Actualment, el *Virus de la síndrome reproductiva i respiratòria porcina* (PRRSV)¹ representa una de les malalties més costoses pels sistemes intensius de producció porcina.

Basant-se en els registres de 80 granges comercials entre 400 i 15.800 reproductores, Holtkamp *et al.* (2013) van establir que les pèrdues anuals provocades pel PRRSV eren de 664 milions U\$, amb uns costos sanitaris addicionals (vacunes, tractaments i diagnòstic) de 140,11 milions U\$.

A Europa, un estudi en nou granges durant les 18 setmanes posteriors a un brot de PRRS, va estimar unes pèrdues de 126 €/truja (Nieuwenhuis *et al.*, 2012).

Els costos directes de la infecció pel PRRSV deriven dels avortaments i l'augment de la mortalitat en lactants. Els costos indirectes, entre d'altres, deriven dels tractaments associats a la pneumònia i infeccions secundàries, el diagnòstic, els dies no productius, els costos d'alimentació i el retard en el creixement.

El control d'aquesta malaltia radica en diferents fronts: el diagnòstic precoç i el monitoratge, la bioseguretat, el maneig i la immunització. Per tant, les tècniques diagnòstiques utilitzades són claus per a l'obtenció d'informació veraç que ajudi a assolir els objectius marcats en programes de control i eradicació del virus.

1. Breu història del virus de la síndrome reproductiva i respiratòria porcina

Els primers brots del PRRS es van veure entre el 1987 i el 1988 en tres estats nord americans: Carolina del Nord, Iowa i Minnesota. Es tractava d'una malaltia desconeguda fins llavors que es caracteritzava per avortaments, mortalitat neonatal i quadres respiratoris en els garrins (Hill, 1990; Keffaber, 1989; Loula, 1991). Donat que se'n desconeixia l'agent, es va anomenar malaltia misteriosa del porc (*Mystery Swine Disease*, MSD).

¹ S'ha optat per les sigles en anglès en els casos en què siguin d'ús més universal.

A Europa els primers casos amb signes similars a la MSD es van detectar el novembre de 1990 prop de Münster, Alemanya. En pocs mesos van aparèixer un gran nombre de focus semblants; el maig del 1991 se'n van registrar més de 3.000. Durant aquell mateix any, la malaltia es va estendre per Holanda i Bèlgica, Gran Bretanya i França. A Espanya, a inicis de 1991, es van registrar tres brots, dos a la província de Huesca i un a la província de Lleida (OIE, 1992). Basant-se en els signes clínics, a Europa la malaltia es va designar de diferents maneres: *Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome* (PEARS), *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRS) o *Blue-eared pig disease*. En el continent asiàtic els primers brots es van detectar al Japó el 1988 (Hirose *et al.*, 1995), i posteriorment a Taiwan el 1991 (Chang *et al.* 1993 citat per Zimmerman, 2003a).

El juny del 1991, investigadors del *Central Veterinary Institute* d'Holanda, van aconseguir aïllar i caracteritzar l'agent causant dels brots en aquell país (Wensvoort *et al.*, 1991), així com reproduir-ne la malaltia experimentalment (Terpstra *et al.*, 1991). El van anomenar virus de Lelystad. A nord Amèrica el virus es va aïllar el 1992 i es va designar com VR-2332, complint-se també els postulats de Koch (Benfield *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992). A partir d'aquest moment l'agent etiològic causant dels brots es va anar aïllant en els diferents països on havia aparegut, com per exemple a Gran Bretanya (Paton *et al.*, 1992) i a Espanya (Plana *et al.*, 1992). Finalment, el maig del 1992, en el primer simposium internacional del PRRSV es va acordar utilitzar el nom de *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) i l'Oficina Internacional d'Epizooties així ho va reconèixer.

2. Agent etiològic

2.1 Taxonomia, organització genòmica i estructura vírica

El PRRSV és un virus RNA de cadena simple; polaritat positiva i embolcallat. Pertany a la família *Arteriviridae* dins de l'ordre *Nidovirales*. Dins d'aquest gènere també es troben el *Virus de l'arteritis equina* (EAV), el *Virus elevador de la lactat-deshidrogenasa del ratolí* (LDV) i el *Virus de la febre hemorràgica dels simis* (SHFV).

Actualment l'*International Committee on Taxonomy of Viruses*² (ICTV) reconeix dues espècies de PRRSV, la 1 i la 2 (PRRSV1 i PRRSV2). Aquestes dues espècies es corresponen amb els anteriorment anomenats genotipus 1 o europeu i 2 o nord-americà. El PRRSV1 està present principalment a Europa, encara que s'ha descrit a Àsia (Chen *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2002; Thanawongnuwech *et al.*, 2004) i als EUA (Ropp *et al.*, 2004). El PRRSV2 es distribueix majoritàriament per Amèrica i Àsia (Brar *et al.*, 2015; Stadejek *et al.*, 2008), tot i que ocasionalment es troba a Europa, on circulen soques originades per la vacunació i d'altres no (Balka *et al.*, 2015; Bøtner *et al.*, 1997; Kvisgaard *et al.*, 2013).

Spilman *et al.* (2009) van determinar l'estructura dels virions mitjançant tècniques de microscòpia i tomografia crioelèctriques. El PRRSV presenta una estructura pleomòrfica que varia entre esfèrica i oval, d'un diàmetre entre 50 i 74 nm (mediana = 54 nm). La nucleocàpside, amb un diàmetre de 39 nm de mitjana, consisteix en dues capes entrelaçades de proteïna N que contenen el genoma. L'RNA té aproximadament 15 kilobases (Meulenber *et al.*, 1993) però se'n desconeix la conformació.

El genoma del PRRSV s'organitza en almenys 10 ORF³ (Figura 1). Les ORFs 1a i 1b, que representen entre el 75-80% del genoma, codifiquen dues poliproteïnes, la pp1a i la pp1b. La seva fragmentació enzimàtica dóna lloc a no menys de 14 proteïnes no estructurals (nsp) implicades en la replicació viral. Les nsp1 α i 1 β controlen la transcripció de l'RNA víric i les nsp2, 3 i 5 la maquinària de síntesi d'aquest RNA. L'nsp9 és una RNA-polimerasa (van Dinten *et al.*, 1996), l'nsp10 una helicasa (Seybert *et al.*, 2005, 2000) i l'nsp11 una endoribonucleasa (Nedialkova *et al.*, 2009). Pel que fa a la resta d'nsp no està clara la seva funció (Dokland, 2010; Snijder *et al.*, 2013).

² Font: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> darrera consulta el 9/11/2016.

³ *Open Reading Frame*, marc obert de lectura (seqüència de nucleòtids que potencialment pot codificar una proteïna).

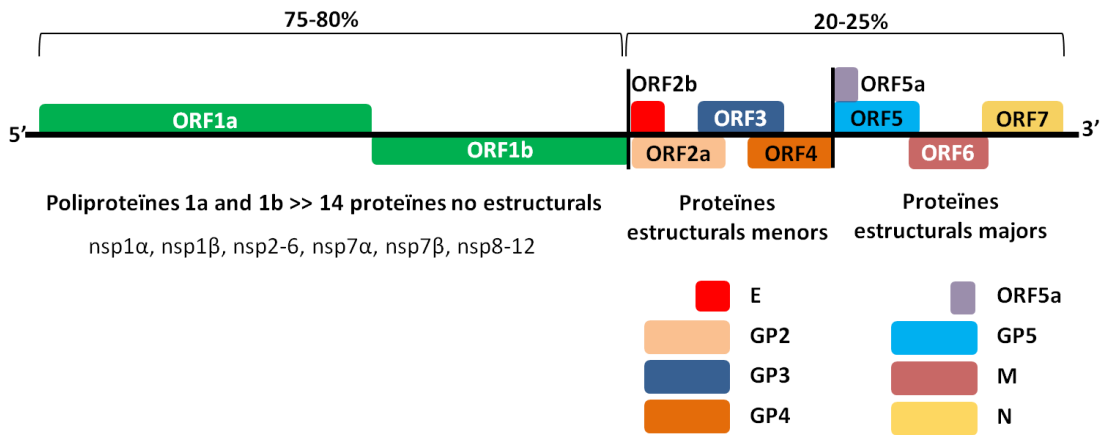


Figura 1. Representació esquemàtica de l'organització del genoma del virus amb la corresponent codificació per proteïnes. Reproduït amb modificacions a partir d'una imatge cedida per Laboratoris HIPRA amb permís dels propietaris⁴.

Des de l'ORF2 a l'ORF7 es codifica per proteïnes estructurals. Les ORF2a, 3 i 4 codifiquen per proteïnes presents en l'embolcall lipídic, la GP2, GP3 i GP4, que estableixen enllaços covalents entre elles formant un complex multimèric necessari per la infecció (Dokland, 2010; Wissink *et al.*, 2005). La ORF2b codifica per la proteïna E; alguns autors suggereixen que desenvoluparia un paper important en l'alliberament del genoma viral en el citoplasma (Lee and Yoo, 2006; Wu *et al.*, 2005, 2001). Les ORF5 i 6 codifiquen la GP5 i la proteïna M, respectivament. Aquestes dues proteïnes també es distribueixen per la bicapa lipídica i formen heterodímers, sent essencials en la construcció de l'embolcall víric de les noves partícules (Wissink *et al.*, 2005) (Figura 2). L'ORF7 codifica per la proteïna N que forma la nucleocàpside (Dea *et al.*, 2000; Dokland, 2010).

Fins al moment, l'última descoberta és la proteïna ORF5a (Firth *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2011), la funció de la qual no està clara, però s'ha comprovat que és essencial per la viabilitat del virus (Snijder *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013).

⁴L'original es pot trobar a: <http://www.prrscontrol.com/wps/portal/prrscontrol/prrs-knowledge/what-is-prrs-virus>

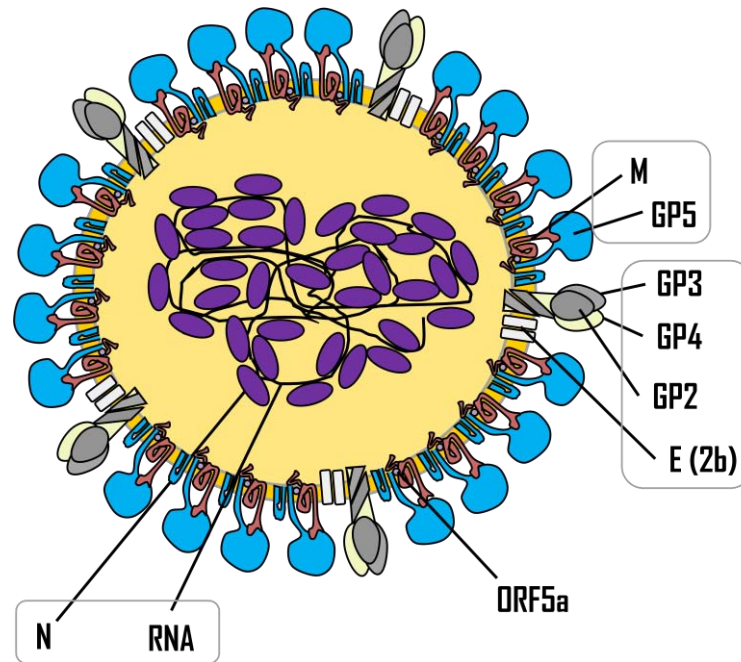


Figura 2. Esquema del PRRSV amb la seva estructura i organització proteica. Reproduït amb modificacions a partir d'una imatge cedida per Laboratoris HIPRA amb permís dels propietaris⁵.

2.2 Cèl·lules diana, entrada del virus en les cèl·lules hoste i replicació

Les cèl·lules diana del PRRSV són els macròfags alveolars porcins (MAP) i alguns tipus de cèl·lules dendrítiques porcines, però no les plasmocitoides (Calzada-Nova *et al.*, 2010; Duan *et al.*, 1997; Flores-Mendoza *et al.*, 2008; Gimeno *et al.*, 2011; Loving *et al.*, 2007; Silva-Campa *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2007; Wensvoort *et al.*, 1991). A més, s'ha suggerit que el virus també es pot replicar en cèl·lules germinals testiculars (Sur *et al.*, 1997).

In vitro, el virus també és capaç de replicar-se en les línies contínues cel·lulars MARC-145 i CL-2621, subclons de les MA-104, línies cel·lulars derivades dels ronyons dels micos (Benfield *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993).

Un possible model d'entrada del virus dins la cèl·lula hoste consistiria en l'adhesió del virus a la superfície de la cèl·lula mitjançant la interacció entre el complex format per les proteïnes M i GP5 i les molècules d'heparan sulfat presents en la

⁵ L'original es pot trobar a: <http://www.prrscontrol.com/wps/portal/prrscontrol/prrs-knowledge/what-is-prrs-virus>

superfície de la cèl·lula hoste (Delputte *et al.*, 2002; Jusa *et al.*, 1997). Seguidament, aquest mateix complex es fixaria d'una forma més estable interactuant amb la sialoadhesina (CD169) i es produiria l'endocitosi (Delputte *et al.*, 2005; Duan *et al.*, 1998; Van Breedam *et al.*, 2010; Vanderheijden *et al.*, 2003). Un cop internalitzat el virus, el receptor CD163 interactuaria amb la GP2 i GP4 i es produiria l'acidificació de l'endosoma, la fusió de la membrana del virus i l'alliberament del genoma víric al citosol (Calvert *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). Al mateix temps, també s'han estudiat altres receptors que podrien participar en l'entrada del virus en les cèl·lules hoste. Fins ara s'han identificat la vimentina (Kim *et al.*, 2006), el CD151 (Shanmukhappa *et al.*, 2007) i el DC-SIGN (CD209) (Huang *et al.*, 2013, 2009; Zhang and Yoo, 2015). No obstant, fins ara el CD163 és reconegut com l'únic receptor essencial i, de fet, la seva expressió o manca determinen la susceptibilitat a la infecció *in vitro* o *in vivo* (Delrue *et al.*, 2010; Patton *et al.*, 2009; Whitworth *et al.*, 2015).

Un cop el virus ha entrat dins la cèl·lula hoste comença el procés de replicació, l'antigen víric i les partícules víriques completes es poden detectar a partir de les sis i nou hores postinfecció (PI), respectivament (Pol *et al.*, 1997). L'alliberament d'aquestes partícules seria el resultat de la lisi de la cèl·lula (Kim *et al.*, 2002). Tanmateix, sense saber-ne el mecanisme, diversos estudis han comprovat que moltes de les cèl·lules que entren en apoptosi no estan infectades (Costers *et al.*, 2008; Labarque *et al.*, 2003; Sur *et al.*, 1998).

2.3 Origen i evolució del PRRSV

Estudis seroepidemiològics realitzats als EUA i Canadà demostrarien que el virus ja circulava per les poblacions porcines abans dels brots del 1987. A Ontario (Canadà) els sèrums més antics amb anticossos anti-PRRSV daten del 1979 (Carman *et al.*, 1995); a Iowa, del 1985 (Hill *et al.*, 1992) i a Minnesota, del 1986 (Yoon *et al.*, 1992). A Europa els anticossos contra el PRRSV anteriors als primers brots clínics es detectaren en sèrums de l'antiga República Democràtica Alemanya recollits el 1987 (Ohlinger *et al.*, 2000). Una interpretació d'aquests resultats podria ser que el sorgiment clínic del PRRSV seria degut a l'aparició de soques més virulentes pel pas

d'una producció porcina de nivell familiar a una altra a gran escala, augmentant la possibilitat de replicació i variació gènica del virus.

Sobre l'origen del PRRSV existeixen diverses hipòtesis. Plagemann (2003) planteja l'aparició del virus com a resultat del salt d'un ancestre de l'LDV des del ratolí al porc senglar en algun moment del segle XIX a l'est d'Europa. El virus hauria arribat a l'Amèrica del nord per la introducció de porcs senglars europeus infectats i evolucionat independentment en cada continent. Finalment, hauria fet el salt del senglar al porc domèstic. No obstant, per sostenir aquesta teoria caldria demostrar l'existència d'una baula intermitja amb el PRRSV actual.

Stadejek *et al.* (2006, 2002) també situen l'ancestre comú a l'est d'Europa. Segons aquests autors, el PRRSV s'hauria originat als països de l'antiga Unió Soviètica i entrat a l'oest d'Europa com a conseqüència de la caiguda del mur de Berlín el 1989. L'explosió epidèmica del 1990 seria el resultat de la introducció del virus en la ramaderia porcina intensiva i sense immunitat prèvia de l'Europa occidental. A l'est d'Europa s'hi haurien declarat pocs casos degut a la immunització prèvia de les poblacions (Ohlinger *et al.*, 2000). Aquesta teoria és difícil de validar.

Per una altra banda, existeixen hipòtesis divergents sobre el moment d'aparició de l'ancestre comú del virus. Segons Hanada *et al.* (2005), el virus hauria aparegut als anys 80 i la seva elevada taxa de mutació li hauria permès evolucionar molt ràpidament. Forsberg (2005) en canvi, situa l'ancestre 100 anys abans amb una evolució més lenta en els dos continents. Aquesta i altres divergències entre estudis s'explicarien per l'alt nivell de recombinació detectat en l'ORF5 del PRRSV1 (Martín-Valls *et al.*, 2014). La majoria de les anàlisis filogenètiques realitzades fins ara estan basades en l'ORF5 i no tenen en compte el fenomen de la recombinació. Per introduir-lo caldria basar els estudis en el genoma sencer i no només en una part.

Pel que fa al continent asiàtic, la majoria de soques aïllades pertanyen al PRRSV2 i algunes comparteixen una alta similitud amb la vacuna atenuada (VA) (An *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2010). Aquestes troballes ens durien a pensar que el PRRSV fou introduït a Àsia per la importació d'animals vacunats i/o infectats provinents d'Amèrica del nord.

3. Signes clínics

La infecció pel PRRSV es pot manifestar de maneres diverses, des d'una forma subclínica a un brot devastador. Aquesta variabilitat pot ser causada per diferents factors que inclouen la virulència de la soca; el fons genètic de l'hoste, el seu estat immunitari i l'edat; les infeccions concomitants i el maneig.

Quan el PRRSV1 entra en un ramat immunològicament verge, es desencadena una epidèmia. Inicialment, la manifestació clínica més rellevant són els problemes reproductius. En les truges gestants de més de 90 dies es pot produir l'avortament, amb l'expulsió de fetus frescos i momificats (Terpstra *et al.*, 1991). Així com parts prematurs o, si la gestació arriba a terme, el naixement de garrins dèbils, sovint virèmics i amb una alta mortalitat fins al deslletament (Gordon, 1992; Hopper *et al.*, 1992).

En garrins, el PRRSV predisposa a les infeccions secundàries, sent un cofactor del complex respiratori porcí juntament amb d'altres patògens vírics o bacterians (Allan *et al.*, 2000; Brockmeier *et al.*, 2000; Galina *et al.*, 1994; Harms *et al.*, 2001; Palzer *et al.*, 2015; Thacker *et al.*, 1999). En els garrins de transició i porcs d'engreix, el PRRSV es manifesta típicament amb signes respiratoris i amb un increment de les taxes de mortalitat, retard en el creixement, i una dispersió de pesos a la sortida de cada fase. De totes maneres, la simptomatologia respiratòria sembla ser molt dependent de la soca i, en general, el PRRSV2 es considera més pneumovirulent que el PRRSV1 (Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). En els verros, la infecció sol cursar de forma subclínica però pot causar una disminució de la qualitat seminal (Prieto *et al.*, 1996a).

4. Patogènia

La infecció pel PRRSV es pot dividir en dos estadis: una fase virèmica, que coincideix amb la fase clínica aguda, i una fase no virèmica de major durada (Figura 3).

El PRRS és una malaltia multisistèmica. La via d'entrada del virus pot ser oronasal, sexual o percutània. La primera replicació es produeix en els macròfags del punt

d'entrada, per exemple en la tonsil·la i, depenent de l'edat i la genètica de l'hoste o de la soca del virus, entre 12 i 24h després s'inicia la virèmia. Aquest estadi pot durar entre 3 i 6 setmanes aproximadament, amb un pic entre els dies 7 i 10 PI (Halbur *et al.*, 1996; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). En general, en animals adults la virèmia té una durada més curta, menor de 15 dies (van der Linden *et al.*, 2003).

El virus infecta preferentment els macròfags pulmonars, però es pot replicar en els teixits limfoides (tonsil·les, timus, plaques de Peyer, alguns limfonodes i melsa); placenta i teixits fetals, segons l'estadi de gestació (Lager and Mengeling, 1995; Mengeling *et al.*, 1994; Prieto *et al.*, 1996) i tracte reproductiu masculí (Prieto *et al.*, 2003). Alguns autors, utilitzant tècniques immunohistoquímiques, han descrit esporàdicament l'RNA viral en altres òrgans com els ronyons, el cor o el cervell (Lawson *et al.*, 1997; Sur *et al.*, 1996). Les lesions durant aquesta fase, sovint només a nivell microscòpic, es caracteritzen per una pneumònia intersticial, limfoadenopatia, vasculitis, miocarditis i encefalitis (Rossow *et al.*, 1995).

Al cap d'algunes setmanes, la virèmia es resol i s'inicia una fase llarga on el virus roman fonamentalment en els teixits limfoides secundaris (tonsil·la i limfonodes) i eventualment en els pulmons, mantenint una replicació de baix nivell (Allende *et al.*, 2000; Horter *et al.*, 2002; Rossow *et al.*, 1994; Sur *et al.*, 1996). En aquesta fase la transmissió és possible ja que el virus pot ser excretat, tan en garrins com en truges (Bierk *et al.*, 2001; Charpin *et al.*, 2012; Rowland *et al.*, 2003).

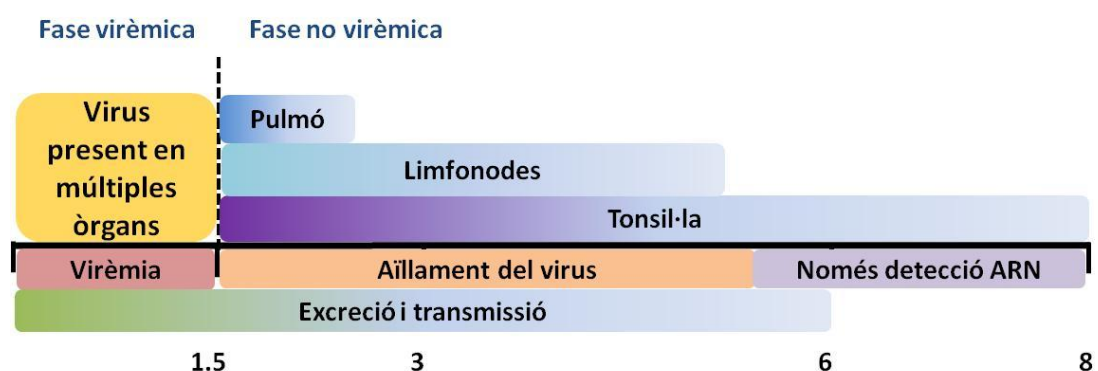


Figura 3. Cronologia de la patogènia del PRRSV. Virèmia, reduïdes de replicació, capacitat de detecció i de transmissió del virus. El temps està representat en mesos. La durada de cada fase és aproximada ja que pot variar segons la soca del virus, l'edat dels animals i el moment d'infecció.

La dilatació d'aquesta segona fase tindria lloc només en alguns animals, sobretot en els que s'han infectat en edats joves o *in utero*. El virus seguiria persistent en els teixits limfoides, al mateix temps que aniria disminuint gradualment la seva excreció (Rowland *et al.*, 2003; Wills *et al.*, 1997c; 2003). La transmissió més tardana entre un animal infectat congènitament i un sentinella la van detectar Rowland *et al.* (2003) als 112 dies postpart. En el mateix sentit, la detecció de l'RNA víric per RT-PCR fou als 251 dies PI en sèrum i tonsil·les (Wills *et al.*, 2003). Finalment, el virus seria eliminat de l'organisme, sent els òrgans limfoides els últims reductes per a la replicació vírica.

5. Immunitat

La resposta immunitària desenvolupada enfront del PRRSV és inusual ja que, malgrat que els anticossos es desenvolupen de forma ràpida, l'activitat neutralitzant no apareix fins la tercera o quarta setmana d'infecció i, fins i tot, en alguns casos, no es desenvolupa. En paral·lel, la resposta de tipus cel·lular mostra alts i baixos durant moltes setmanes. La causa d'aquest patró podria ser la modificació de la resposta immunitària per part del virus.

5.1 Immunitat innata

Les citoquines alliberades en els primers estadis de la resposta immunitària innata són claus per al desenvolupament d'una resposta específica (adquirida) adequada. Entre aquestes citoquines els interferons tipus I (IFN-I) i el TNF- α són essencials per obtenir una resposta antivírica eficient.

Com ja s'ha esmentat abans, macròfags i cèl·lules dendrítiques (CD) són les principals dianes del virus. Ja en estudis inicials es va veure que el PRRSV inhibia les respostes d'IFN en MAP (Albina *et al.*, 1998; Buddaert *et al.*, 1998).

En el cas de les CD, Loving *et al.* (2007) van mostrar que les respostes de les cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits enfront el virus tenien escassa presència d'IFN. Al seu torn, Gimeno *et al.* (2011) van veure que les cèl·lules derivades de la medul·la òssia (BMDC) no secretaven IFN- α en resposta al PRRSV1, encara que en funció de

la soca es produïa l'alliberament de TNF- α . Al seu torn, Baumann *et al.* (2013) van demostrar que la inhibició de l'IFN- α en CD era major pel PRRSV2 que pel PRRSV1, i no afectava a les CD plasmocitoides.

No obstant això, també és cert que no en totes les soques del PRRSV2 la inhibició de l'IFN- α es produeix de la mateixa manera, i fins i tot n'hi ha algunes que el potencien (Lee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2010). Per tant, la capacitat per modular la resposta innata per part del PRRSV és molt més complexa i segurament molt lligada a la soca i a l'hoste (Murtaugh and Genzow, 2011).

Diversos estudis assenyalen determinades proteïnes víriques com les responsables d'aquesta modulació immunitària: les nsp1 α i β , l'nsp2, l'nsp11 i l'nsp4 (Beura *et al.*, 2010; Calzada-Nova *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014; Rascón-Castelo *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2014, 2010).

5.2 Immunitat adquirida

El fet que les cèl·lules diana del virus siguin els macròfags i les cèl·lules dendrítiques, ambdues cèl·lules presentadores d'antigen (CPA), estaria relacionat amb la lenta i irregular resposta cel·lular i humoral.

5.2.1 Immunitat cel·lular

En molts dels models d'infecció vírica la polarització Th1 i els nivells d'IFN- γ es correlacionen amb l'eliminació de la infecció. En la infecció pel PRRSV però, aquesta citoquina mostra un increment retardat i irregular, i no és fins passats uns mesos des del primer contacte amb el virus quan s'arribaria al llindar mínim per a la protecció (Díaz *et al.*, 2006, 2005; Meier *et al.*, 2003). Aquesta alteració es pensa que podria ser deguda a diferents factors. En primer lloc, les mateixes nsp2, 5, 9, 10 i 11 del virus inhibirien l'IFN- γ i induirien l'IL-10 (Burgara-Estrella *et al.*, 2013; Rascón-Castelo *et al.*, 2015). Per una altra banda, la baixa presència d'IFN- α i l'increment d'IL-10 causarien la disminució de les cèl·lules productores d'IFN- γ (CP-IFN- γ) (Bautista and Molitor, 1999, 1997; Díaz *et al.*, 2006, 2005; Lamontagne *et al.*, 2003; López Fuertes *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2003).

Al mateix temps, tot i que es detecta un augment en la producció de limfòcits CD8⁺ en sang, pulmó i òrgans limfoides (Lamontagne *et al.*, 2001), s'ha comprovat que no són efectius per l'eliminació del virus (Lohse *et al.*, 2004). Per tant, es pensa que aquests limfòcits no serien específics del virus sinó que serien resultat de l'augment de les citoquines IL-10 i IL-6 (Díaz *et al.*, 2005).

De tota manera, no està clar que l'augment de l'IL-10 estigui causat per la infecció del PRRSV; l'edat de l'animal i altres factors també hi podrien jugar un paper important (Klinge *et al.*, 2009). Aquestes hipòtesis, basades en la dinàmica de les citoquines i el seu reflex en la immunitat cel·lular encara no han estat ben contrastades *in vivo* (Murtaugh and Genzow, 2011).

5.2.2 Immunitat humoral

Els primers anticossos enfront del virus apareixen a partir del dia 7 PI, i no és fins el 14 quan es detecten en la majoria d'animals. La desaparició d'aquests anticossos té una variació individual més gran; almenys fins els 2-3 mesos no comencen a disminuir i fins desaparèixer poden tardar uns 8 mesos (Albina *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2005; Horter *et al.*, 2002; Meier *et al.*, 2003; Rowland *et al.*, 2003). Malgrat això, aquests anticossos van dirigits majoritàriament enfront de la nucleocàpside i no tenen capacitat neutralitzant (Yoon *et al.*, 1992).

Els anticossos neutralitzants (AN) solen aparèixer entre les 3 setmanes i els 3 mesos PI. Tot i això, el desenvolupament d'AN depèn de la soca i de la idiosincràsia individual de l'animal (Díaz *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Labarque *et al.*, 2000; Loemba *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2007; Meier *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2015; Tribble *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 1994).

El paper d'aquests anticossos és discutit. *In vitro*, són capaços de bloquejar la infecció dels macròfags o altres cèl·lules susceptibles com per exemple les MARC-145 (Delputte *et al.*, 2004). *In vivo*, la transferència d'una dosi suficient d'AN preformats evita la virèmia en un model homòleg (Lopez *et al.*, 2007; Osorio *et al.*, 2002), demostrant el paper protector d'aquests AN en aquest cas concret. No està clar però, quin paper tenen en l'eliminació de la infecció en animals no immunes, ja que diversos estudis han demostrat la desaparició de la virèmia en absència de

detecció d'AN (Díaz *et al.*, 2006, 2005). Una possible explicació a aquest fenomen seria la manca de macròfags permissius pel manteniment de la replicació vírica. Això explicaria també que en les infeccions de llarga durada, el virus quedés delimitat en els òrgans rics en macròfags com els teixits limfoides (Xiao *et al.*, 2004). Tot i així, aquesta hipòtesi no ha estat provada.

Una qüestió que es creu fonamental és saber quins són exactament els epítops que confereixen protecció, tan humoral com cel·lular. Actualment es pensa que el major epítop de neutralització es troba en la GP5 (Gonin *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 1994), tot i que alguns estudis han suggerit que d'altres proteïnes com la GP4 o la proteïna N també podrien contenir epítops de neutralització tan o més immunogènics (Díaz *et al.*, 2009).

Per una altra banda, les glicosilacions que es produeixen en diversos punts de la GP5, o en d'altres proteïnes com la GP3 o la GP2, també podrien jugar un paper important en la neutralització del virus. Aquests sucres podrien emascarar l'epítop i així ser detectat més difícilment pels AN (Ansari *et al.*, 2006; Faaberg *et al.*, 2006).

Malgrat aquestes hipòtesis, manca una prova definitiva de la relació tan d'aquests epítops de neutralització com de les glicosilacions, amb la sensibilitat detectada de diferents soques a la neutralització (Martínez-Lobo *et al.*, 2011b). A més, també caldria verificar si realment la neutralització de GP5 és clau en la protecció contra el PRRS, ja que almenys per l'ORF5 s'han proposat altres explicacions per les glicosilacions, incloent diferents variacions de l'ORF5a (Robinson *et al.*, 2013).

Altres autors han plantejat que podrien existir epítops de distracció (Ostrowski *et al.*, 2002). De fet, s'han descrit dos epítops molt propers en la GP5, l'A i el B. L'epítop A seria immunodominant però no induiria anticossos neutralitzants; i l'epítop B, seria no immunodominant però sí neutralitzant i estimularia una resposta efectiva però retardada en el temps. Per tant, l'epítop A actuaria com a esquer pels anticossos i retardaria la inducció d'AN causada per l'epítop B. No obstant, s'ha comprovat que com a resultat de deleccions en la GP5, la gran majoria

de partícules víriques no els contenen aquests epítops de distracció, posant en dubte la rellevància d'aquest tipus d'epítops (Thaa *et al.*, 2013).

Paral·lelament, la resposta massiva d'anticossos no neutralitzants (ANN) podria provocar el fenomen anomenat *Antibody-dependent enhancement* (ADE). L'ADE, descrit àmpliament en altres virus com el dengue (Flipse and Smit, 2015), consisteix en la facilitació de l'entrada del virus dins de les cèl·lules hoste per part dels ANN (Gu *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2011; Sullivan, 2001; Yoon *et al.*, 1996). Tanmateix, no està clara la seva importància real ja que no s'ha demostrat una relació directa entre l'augment d'ANN i l'exacerbació dels signes clínics (Prieto *et al.*, 2011); i al camp, tampoc s'ha comprovat que l'aparició d'alguns brots pugui anar lligada a revacunacions (Murtaugh and Genzow, 2011).

Tot i el retard en l'aparició dels AN, Lager *et al.* (1997a; 1997b) van demostrar que truges infectades amb una determinada soca de PRRSV desenvolupaven una memòria immunitària que neutralitzava eficaçment aquesta mateixa soca en una segona infecció. A més, van comprovar que aquesta immunitat homòloga perdurava en el temps i podria arribar a cobrir la vida productiva dels animals.

Posteriorment, es van dur a terme més estudis sobre protecció enfront del PRRSV per al desenvolupament de vacunes. Labarque *et al.* (2004) van observar que com més propers filogenèticament eren la soca vacunal i la de camp, més protecció es conferia als animals. Per tant, es va pensar que la resposta immune enfront del PRRSV tindria un cert grau d'especificitat de soca. En aquesta mateixa direcció, altres estudis van comprovar que la protecció total s'aconseguia només en els desafiaments homòlegs, ja que en els heteròlegs les vacunes atenuades (VA) tan sols proporcionaven una protecció parcial (Mengeling *et al.*, 2003a). Tanmateix, la relació entre proximitat filogenètica i protecció, almenys basada en l'ORF5, no quedava tan clara (Prieto *et al.*, 2008).

Estudis més recents han mostrat que segons el model d'immunització, homòleg o heteròleg, i la soca utilitzada, la immunitat desenvolupada pot ser diferent (Díaz *et al.*, 2012b). En alguns casos pot ser de caire més cel·lular i en altres més humoral. A més, sota certes circumstàncies, la immunitat heteròloga pot ser més eficaç que

l'homòloga. No es coneix una explicació clara per aquest fenomen però al mateix temps, Martínez-Lobo *et al.* (2011b) també van demostrar que no sempre els AN homòlegs eren més eficients que els heteròlegs. A part dels epítops de neutralització i el nombre i localització de les glicosilacions, altres explicacions podrien ser canvis en la conformació dels epítops o l'existència d'altres epítops encara desconeguts.

6. Epidemiologia

El virus es pot transmetre de manera vertical o horitzontal. Horitzontalment, la transmissió pot ser directa o indirecta.

6.1 Transmissió vertical

El pas del virus des de les mares als fetus a través de l'endometri i la placenta dona lloc a garrins virèmics. Segons els estudis realitzats fins ara la proporció de garrins virèmics al naixement pot variar entre el 20-100% de la garrinada (Cano *et al.*, 2009; Kranker *et al.*, 1998; Mengeling *et al.*, 1998, 1994; Rowland *et al.*, 2003), segons la dosi d'inoculació, la soca del virus, el moment de la infecció i si es detecta el virus per aïllament o per qRT-PCR. Aquests animals desenvolupen un paper clau en l'epidemiologia de la malaltia, ja que permeten el salt del virus des de les maternitats a les transicions, i la perpetuació de la circulació vírica en les granges (Cano *et al.*, 2009). En la majoria dels casos, aquesta transmissió es limita a l'últim terç de la gestació (Christianson *et al.*, 1992; Kranker *et al.*, 1998; Lager *et al.*, 1997a, 1996; Lager and Mengeling, 1995; Mengeling *et al.*, 1994; Prieto *et al.*, 1997; Terpstra *et al.*, 1991), no havent-hi gaires diferències entre soques (Mengeling *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1996). Aquesta delimitació temporal és probablement el reflex de la quantitat de macròfags permissius (CD163⁺ i CD169⁺) presents en la placenta, que augmentarien a mesura que avança la gestació (Karniychuk *et al.*, 2011). La replicació del virus en aquests teixits causaria l'apoptosi de les cèl·lules locals, el deteriorament funcional de la placenta i finalment, la mort fetal. La infecció passaria d'un fetus a l'altre a través de les adherències entre les membranes fetals (Karniychuk and Nauwynck, 2013; Rowland *et al.*, 2003).

6.2 Transmissió horitzontal

6.2.1 Directa

Donada l'excreció per les diferents vies i la dosi infectiva mínima (DIM) necessària per a produir-se la infecció (Taula 1), la probabilitat d'una transmissió efectiva varia en cada cas.

Taula 1. (Modificada a partir d'una comunicació personal de Mateu, E). Dosi infectiva mínima (TCID₅₀)⁶ necessària per la transmissió del PRRSV1 segons el tipus de via d'entrada i concentració vírica màxima excretada en diferents fluids corporals on el virus ha estat detectat.

Via d'entrada	Dosi infectiva mínima	Via d'excreció	Concentració vírica màxima
Oral	10 ^{5.3} TCID ₅₀	Fluids orals	10 ^{4.3} TCID ₅₀ /mL
Intranasal	10 ^{4.0} TCID ₅₀	Secreció nasal	10 ^{4.3} TCID ₅₀ /mL
Sexual	10 ^{3.3} TCID ₅₀	Semen	10 ^{6.0} TCID ₅₀ /mL
Percutània	10 ^{2.2} TCID ₅₀	Sang	10 ^{4.0} TCID ₅₀ /mL

Pel que fa a les vies d'entrada poden ser diverses: oronasal, sexual o percutània, amb diferents DIM necessàries per a què tingui lloc la infecció. Hermann *et al.* (2005) demostraren que, pel PRRSV2, 10^{5.3} i 10^{4.0} TCID₅₀ eren necessàries per la infecció via oral o intranasal, respectivament. En el mateix experiment, en van tenir prou amb 10^{2.2} TCID₅₀ per infectar els animals sentinella via intramuscular. En canvi en un altre estudi, utilitzant la mateixa espècie de PRRSV, ≤10 partícules d'aïllat ISU-P van ser suficients per la infecció via intranasal i intramuscular (Yoon *et al.*, 1999). De fet, la soca utilitzada en la inoculació pot variar els resultats. Pel que fa a la transmissió sexual, Benfield *et al.* (2000) van calcular que era necessària una dosi de 10^{3.3} TCID₅₀ per inseminació artificial per tal de produir la infecció de llavors.

Pel que fa a les vies d'excreció, la presència del virus en la sang ha estat la més estudiada (Duan *et al.*, 1997). En els fluids orals, el PRRSV1 s'ha detectat a partir dels 7 dies PI i el PRRSV2 a partir del dia 1 PI. En ambdós casos, el virus pot

⁶ TCID₅₀ = 50% Tissue Culture Infective Dose. Quantitat de virus necessària per produir un efecte citopàtic en el 50% de les cèl·lules del cultiu cel·lular.

continuar sent excretat per aquesta via acabada la virèmia, tot i que de manera intermitent (Decorte *et al.*, 2015; Kittawornrat *et al.*, 2010; Wills *et al.*, 1997b).

Respecte a les secrecions nasals, pel PRRSV1 Duan *et al.* (1997) el van aïllar en 4/8 animals a dia 3 PI i en 1/8 a dia 7 PI. Utilitzant tècniques d'RT-PCR, Charpin *et al.* (2012) van detectar en garrins un pic de càrrega viral en l'excreció nasal a dia 2 PI que va anar gradualment disminuint fins a dia 48 PI. En un experiment de transmissió semblant, Pileri *et al.* (2015) van detectar l'excreció nasal del virus en el 80% dels animals en algun moment de la infecció. El període d'excreció va ser molt variable individualment (1-14 dies). Pel PRRSV2 i emprant l'aïllament viral, Rossow *et al.* (1994) el van detectar de manera molt escassa en animals d'una, quatre i deu setmanes d'edat. En un altre estudi amb truges inoculades, Christianson *et al.* (1993) van aïllar el virus del dia 3 al dia 9 PI.

Part d'aquesta variabilitat entre soques s'explicaria per la diferent replicació del virus a nivell de mucosa nasal. Soques més virulentes com la Lena, aconsegueixen infectar a diferents tipus de macròfags en la mucosa nasal, en canvi, en soques menys virulentes com el PRRSV1, el ventall de macròfags permissius és més reduït (Frydas *et al.*, 2015; Frydas and Nauwynck, 2016; Frydas *et al.*, 2013).

En el semen, el PRRSV es pot començar a detectar entre els dies 2 i 5 PI. El virus es va aïllar per primer cop a dia 7 PI (Prieto *et al.*, 1996a) però per RT-PCR s'ha arribat a detectar, sovint de manera intermitent, fins el dia 92 PI. Aquesta durada pot variar molt segons la raça i l'animal (Christopher-Hennings *et al.*, 2001, 1995a, 1995b; Nielsen *et al.*, 1997; Swenson *et al.*, 1994; Wasilk *et al.*, 2004). El virus s'ha aïllat tan a la glàndula bulbouretral com a l'epidídim (Christopher-Hennings *et al.*, 1995b; Prieto *et al.*, 2003), per tant podria ser que persistís una replicació basal en el tracte sexual masculí que mantindria un potencial de transmissió pel semen durant un llarg període de temps.

El PRRSV també s'ha detectat en orina, secrecions mamàries i femtes, tot i que l'excreció per aquestes vies és dèbil i irregular (Christianson *et al.*, 1993; Pileri *et al.*, 2015; Rossow *et al.*, 1994; Wagstrom *et al.*, 2001; Wills *et al.*, 1997b).

Tenint en compte els valor presentats a la Taula 1, la DIM és suficientment alta per a què calgui un contacte repetit i prolongat entre els animals per la transmissió del virus. La via percutània seria la que necessitaria menys quantitat de virus d'entrada. Per la seva part, l'excreció per fluids orals, tot i que irregular, es podria allargar en el temps i ser infectiva (Bierk *et al.*, 2001; Decorte *et al.*, 2015; Kittawornrat *et al.*, 2010). Tenint també en compte el comportament dels porcs, una hipòtesi seria que la via principal de transmissió entre els animals fos el contacte fluids orals infectats amb zones de trencament de la barrera epitelial. Per exemple, en baralles o caudofàgia (Bierk *et al.*, 2001). Per una altra banda, el maneig estàndard d'una granja també hi podria jugar un paper important. La posada de cròtals, tall de cues o de dents, o la injecció de tractaments com el ferro, antibiòtics o vacunes en serien alguns possibles exemples (Pileri and Mateu, 2016; Zimmerman, 2003b).

6.2.2 Indirecta

En general, en el PRRSV se'n contemplen tres tipus: els fòmites, els vectors mecànics i l'aerògena.

El PRRSV és un virus molt làbil a temperatures temperades i amb humitats altes. Per tant, la transmissió és més fàcil en un ambient fred i sec (Dee *et al.*, 2003, 2002). Els principals fòmites són els vehicles de transport d'animals, utensilis de granja o vestimenta (Dee *et al.*, 2004). Pel que fa als artròpodes, s'ha comprovat que en les mosques el virus no s'hi replica però són capaces de dispersar-lo (Otake *et al.*, 2004, 2003; Schurrer *et al.*, 2005).

La transmissió aerògena s'ha demostrat experimentalment efectiva per a distàncies curtes, amb aerosols d'alta concentració de virus i exposicions de llarga durada (Dee *et al.*, 2005; Otake *et al.*, 2002). Kristensen *et al.* (2004) van demostrar que el virus podia ser transmès pels sistemes de ventilació de les granges. De fet, Hermann *et al.* (2009), amb l'aïllat VR-2332 del PRRSV2, van quantificar una DI_{50} ⁷ de $10^{3.1}$ TCID₅₀. Cutler *et al.* (2011) també van calcular la DI_{50} amb l'aïllat MN-184 del PRRSV2 i el resultat fou de $10^{2.35}$ TCID₅₀. En aquest tipus de transmissió hi tindria un paper important la soca (Torremorell *et al.*, 1997), les condicions de velocitat de l'aire, la

⁷ DI_{50} = Dosi infectiva 50%. Dosi amb la qual s'aconsegueix la infecció del 50% dels animals.

humitat relativa i la temperatura (Brockmeier and Lager, 2002; Hermann *et al.*, 2007).

6.3 Dinàmica de la infecció del PRRSV en una granja

Quan el PRRSV entra en una granja indemne, generalment es produeix un brot reproductiu que s'estén entre les truges. L'epidèmia evoluciona fins que la densitat d'animals susceptibles és reduïda, produint-se llavors un silenci epidèmic aparent. Això succeeix entre 1 i 4 mesos des del començament del brot, en funció de la grandària de la població, la seva distribució i el contacte entre els animals (Nodelijk, 2002; Stevenson *et al.*, 1993).

Durant la fase epidèmica, segons un estudi realitzat recentment amb el PRRSV1, el percentatge d'animals nascuts virèmics oscil·laria entorn del $28.45 \pm 18.1\%$ ($IC_{95\%} = 17.75-39.14\%$) (Martín-Valls *et al.*, unpublished).

Aquests animals contagiaran el virus a la resta de garrinada durant la lactació i, a la resta del corral durant la transició. Aquesta disseminació del virus es traduirà en un augment dels problemes respiratoris i una afectació del creixement en aquests estadis (Done *et al.*, 1996). En transicions de tot dins/tot fora, el virus es pot mantenir de dues maneres, o bé per un flux de garrins virèmics des de les maternitats, o bé per una contaminació en les instal·lacions que no s'elimina amb el buit sanitari practicat.

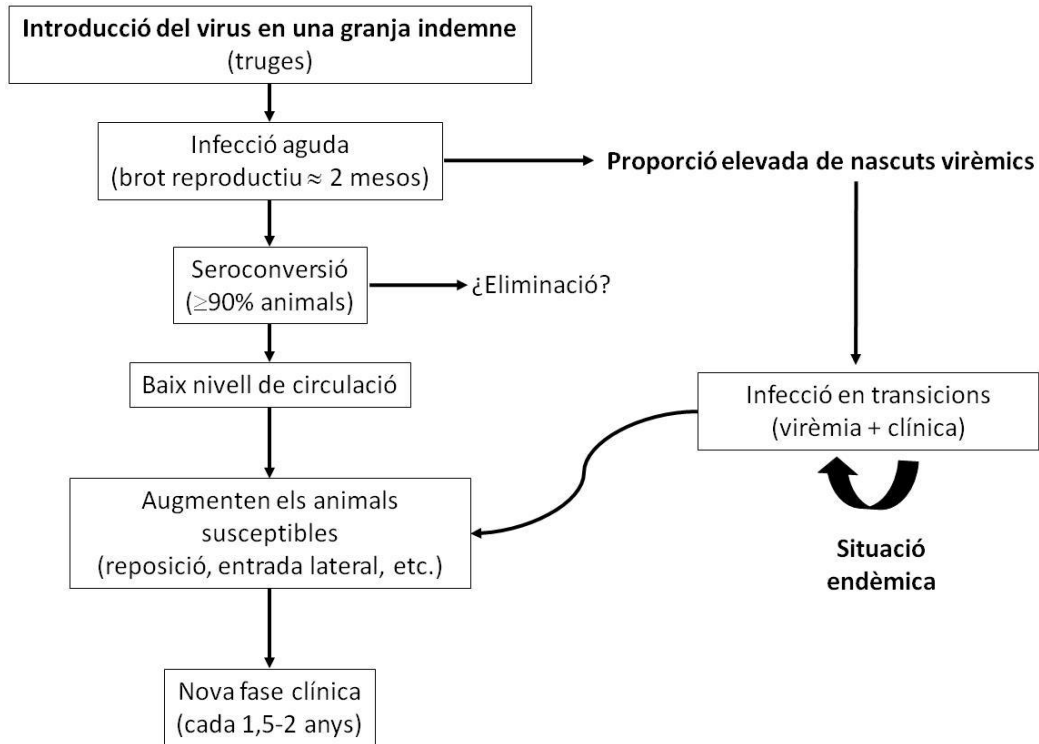


Figura 4. Esquema de la dinàmica d'infecció del PRRSV en una granja. Modificat a partir d'una figura cedida pel projecte CONPRRS.

Quan es tracta de granges petites on és possible que tota la població quedi immunitzada, quasi de forma simultània el virus pot arribar a extingir-se. En poblacions grans en canvi, sovint queden subgrups que no s'infecten i perpetuen una circulació vírica de baix nivell (Nodelijk *et al.*, 2000). A mesura que passa el temps, o bé perquè els animals perden la immunitat o per l'entrada de nous animals no immunitzats, la població susceptible va augmentant fins a ser suficientment gran per a què es doni un nou brot. Habitualment, aquest procés segueix un cicle de 1.5-3 anys (Nodelijk *et al.*, 2003; Pileri and Mateu, 2016; Stevenson *et al.*, 1993).

7. Diagnòstic

Pel que fa al diagnòstic clínic del PRRS, no existeixen lesions patognomòniques per tant, per un diagnòstic definitiu cal recórrer al laboratori. Segons la tècnica, les

mostres més utilitzades són sèrum, semen, fluids orals, pulmó, tonsil·les, limfonodes o fetus avortats no autolítics.

7.1 Aïllament víric

Aquesta tècnica consisteix en replicar el virus *in vitro* i identificar-lo. Es realitza principalment a partir de sèrum, pulmons i òrgans limfoides (Benfield *et al.*, 1992; Bilodeau *et al.*, 1994; Horter *et al.*, 2002; Rossow *et al.*, 1995).

Cal tenir en compte però, que l'aïllament víric requereix el seu temps i cal disposar de línies cel·lulars específiques pel creixement del virus; les més utilitzades són la MA-104 i la seva derivada, la MARC-145. A més, la sensibilitat de la prova pot variar molt segons la línia cel·lular utilitzada, sent els MAP els més receptius a totes les soques de virus i on es veu més clar l'efecte citopàtic (Bautista *et al.*, 1993). En altres línies cel·lulars on aquest efecte no és tan clar cal confirmar la presència del virus mitjançant tècniques d'immunofluorescència o immunoperoxidasa. Per aquestes raons, actualment no és una tècnica diagnòstica de rutina.

Altres tècniques són la immunohistoquímica i la hibridació *in situ*, útils per detectar el virus en teixits i així associar-ho a les lesions identificades (Lawson *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 1993; Sur *et al.*, 1996). Alguns laboratoris les utilitzen però demanden gran experiència per la seva correcta interpretació. A nivell experimental són tècniques interessants ja que permeten identificar en les infeccions persistents quins són els reductes cel·lulars del PRRSV (Mengeling and Lager, 2000).

7.2 RT-PCR, transcripció inversa i reacció en cadena de la polimerasa

Actualment és la tècnica més utilitzada per la seva immediatesa i major sensibilitat (Cheon and Chae, 2000; Spagnuolo-Weaver *et al.*, 1998) en un ampli ventall de mostres (Gerber *et al.*, 2013), fins i tot en les que es troben en procés d'autòlisi (Benson *et al.*, 2002).

En el cas del diagnòstic del PRRSV els dos tipus d'RT-PCR utilitzats són la de punt final i la d'en temps real (qRT-PCR). Ambdues tècniques es fonamenten en dues reaccions enzimàtiques. La primera és la transcripció del fragment RNA diana a

cDNA⁸. La segona és l'amplificació d'aquest cDNA, gràcies principalment a uns encebadors i a l'activitat d'una polimerasa termostable. A través d'aquest procés, si el fragment d'RNA cercat és present en la mostra podrà ser detectat.

La principal millora de la qRT-PCR respecte a l'RT-PCR a punt final és la quantificació directa del cDNA durant la fase exponencial de l'amplificació, l'única proporcional a la quantitat de cDNA present en la mostra. D'aquesta manera, la quantificació és més acurada. De fet, en l'RT-PCR a punt final el rang exponencial d'amplificació es determina empíricament en la posada a punt de la tècnica.

Un altre factor diferencial és la detecció del producte amplificat. En la qRT-PCR es detecta directament per fluorescència gràcies a una sonda unida a dos fluorocroms que s'hibrida al cDNA. La sonda es trenca per l'acció de la polimerasa i deixa anar la senyal lluminosa. En canvi, en l'RT-PCR a punt final el producte amplificat cal que sigui detectat per algun mètode postamplificació com l'electroforesi en gel d'agarosa amb bromur d'etidi. Aquest pas, duu a uns resultats semiquantitatius amb una alta variació intra i entre anàlisis (30-40% i 50-70%, respectivament).

Altres diferències resideixen en el rang de quantificació ja que els mètodes en temps real tenen un rang dinàmic més gran resultat dels sistemes de detecció fluoromètrics emprats. Per una altra banda, com que l'obtenció de les dades i l'anàlisi en la qRT-PCR es duu a terme en un únic i mateix tub o placa, això incrementa el rendiment, redueix les possibilitats d'acumulació de contaminants, i elimina el procés post-PCR que pot ser una potencial font d'error.

No obstant, la qRT-PCR també té inconvenients, com la manca de controls interns per la detecció d'inhibidors de la reacció. Tots els mètodes quantitatius de PCR assumeixen que l'estàndard i la mostra amplifiquen amb una eficiència similar. En canvi, no es té en compte la possible presència de substàncies que redueixen significativament l'eficiència de la reacció en algunes mostres no conegudes (Bustin *et al.*, 2004).

⁸ cDNA = DNA complementari obtingut a partir de la transcripció de l'RNA a DNA.

7.2.1 La qRT-PCR

La qRT-PCR cal que sigui validada, per tant, cal incloure controls positius i negatius tan en el procés d'extracció de l'RNA com en la mateixa reacció d'RT-PCR. A més, cal tenir en compte certs paràmetres:

Threshold cicle (Ct): és el nombre de cicles necessari perquè el senyal fluorescent d'una mostra determinada superi el soroll de fons i sigui detectat. El Ct està inversament correlacionat amb la quantitat d'RNA present originalment en la mostra.

Eficiència d'amplificació: es calcula a partir de les pendents de la corba estàndard segons l'equació: $E = 10^{(-1/\text{pendent})}$. Aquesta eficiència és clau pel càlcul del nombre de còpies amplifiades. Si l'eficiència fos del 100%, $N_n = N_0 \times 2^n$, però en realitat, sempre hi ha una pèrdua d'eficiència. Per tant, es fan tres assumpcions:

1. El creixement del producte de la PCR és un procés il·limitat en el temps i l'eficiència d'amplificació és igual i constant.
2. Només es té en compte una sola eficiència, per tant es considera que l'eficiència és constant per cada reacció i per cada cicle.
3. Els valors Ct de les mostres es converteixen en concentracions d'RNA a partir de l'equació derivada dels estàndards. Per tant, l'eficiència d'amplificació dels estàndards i de les mostres es considera la mateixa.

Corbes estàndard: l'exactitud de la quantificació depèn totalment dels estàndards ja que la conversió del Ct a la quantitat d'àcid nucleic original s'aconsegueix per una interpolació del valor del Ct de la mostra *versus* la corba obtinguda a partir dels Ct d'una sèrie de dilucions de l'estàndard.

Aquest estàndard cal que sigui validat i optimitzat per qRT-PCR, que pugui detectar amb exactitud fins a 10 molècules/reacció amb una linearitat de la reacció alta (coeficient de correlació; $r > 0.99$). Son acceptables una mitjana de variació del 10-20% dins de la prova i una mitjana entre proves del 15-30%. Com més gran ($>10^7$) i més baix ($<10^3$) és el nombre de còpies, més augmenta la variabilitat de la prova i la magnitud de la influència de les variacions degudes a l'atzar.

La corba estàndard dóna diverses peces d'informació fonamental:

Valor R^2 : és un indicador de la qualitat de l'estàndard i de la fiabilitat del procés de construcció de la seva corba. Per a què l'estàndard sigui acceptat el coeficient $R^2 > 0.98$.

Eficiència d'amplificació: les corbes estàndard òptimes estan basades en eficiències d'amplificació properes al 100%. La pendent de la recta de la corba estàndard es pot utilitzar per determinar l'eficiència de la reacció de PCR amb l'equació: Eficiència = $[10^{(-1/\text{slope})}] - 1$. L'equació que defineix la corba estàndard es pot utilitzar per determinar la concentració o nombre de còpies de l'àcid nucleic objectiu: Nombre de còpies = $10^{((\text{Ct}) - (\text{intercept})) / (\text{pendent})}$. Les lectures de les rèpliques haurien de ser el suficientment properes (aproximadament 0.5 Ct) per validar les anàlisis. Per assegurar que l'eficiència d'amplificació dels estàndards és el més similar possible a la de la mostra aquest estàndard hauria de ser específic d'amplicó.

Y-intercept: el valor d'intercepció és el logaritme de la quantitat de producte de PCR en el llindar en unitats de fluorescència dividit pel logaritme de l'eficiència. Aquest valor indica el límit de sensibilitat de l'anàlisi (Bustin *et al.*, 2004).

Per a tenir en compte les variacions entre diferents plaques degudes als reactius, encebadors i sonda, cal que l'estàndard també sigui analitzat per qRT-PCR per cada reacció.

La qRT-PCR més utilitzada per al diagnòstic del PRRSV és la basada en la detecció de l'ORF7 (Balka *et al.*, 2010, 2009; Lurchachaiwong *et al.*, 2007; Oleksiewicz *et al.*, 1998; Sur *et al.*, 1996; Toplak *et al.*, 2012) ja que es tracta d'una regió del genoma ben conservada i permet fer la diferència entre el PRRSV1 i 2 (Lurchachaiwong *et al.*, 2007). Malgrat això, també s'utilitzen altres dianes com l'ORF5, l'ORF6 o l'nsp9 (Mateu *et al.*, 2003; Spear and Faaberg, 2015; Stankevicius *et al.*, 2016).

7.3 Serologia

S'han desenvolupat diverses tècniques per la detecció d'anticossos contra el PRRSV, la immunofluorescència indirecta (IFI) (Christopher-Hennings *et al.*, 1995b; Wills *et al.*, 1997c) o la immunoperoxidasa en monocapa (IPMA) (van der Linden *et al.*,

2003; Wensvoort *et al.*, 1991). No obstant, actualment la tècnica serològica més utilitzada en la detecció del PRRSV és l'*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Gràcies al seu alt grau d'automatització permet el diagnòstic fiable i objectiu d'un nombre elevat d'animals, relativament ràpid i a baix cost.

La majoria d'ELISA comercials estan dirigits als anticossos enfront de la proteïna N i alguns contenen també antigens de la GP5 (Li and Ren, 2011). Tanmateix, l'ús d'altres pèptids recombinants del virus ha permès desenvolupar ELISA capaços de diferenciar entre el PRRSV1 i PRRSV2, i entre les soques de camp i les vacunals (Brown *et al.*, 2009; Oleksiewicz *et al.*, 2005).

Les sensibilitats i especificitats poden variar entre kits comercials (Mateu *et al.*, 2006; Sattler *et al.*, 2014). De fet, la sensibilitat depèn del propi ELISA però també de la soca del virus. A major sensibilitat, la malaltia serà detectada més precoçment, però en canvi, els anticossos maternals podran suposar un problema d'especificitat (Díaz *et al.*, 2012a).

Els anticossos detectats per ELISA ens indiquen si l'animal ha estat en contacte amb el virus però no guarden una relació directa amb el nivell de protecció de l'animal (Yoon *et al.*, 1994). La detecció dels anticossos neutralitzants seria l'aproximació més raonable però la seroneutralització (SN) és un mètode complicat, llarg i costós (Mengeling and Lager, 2000), per tant només s'utilitza a nivell experimental.

8. Control del PRRSV

La manca d'una estratègia única completament efectiva per evitar l'entrada i la circulació del virus en una granja ha propiciat l'estudi de diferents fronts per aconseguir-ne el control i, finalment, l'eradicació. Es defineixen quatre factors clau, interrelacionats entre sí, que influïrien en el control del PRRSV: a) mesures de bioseguretat per evitar l'entrada i disseminació del virus; b) la vigilància efectiva de la població mitjançant tècniques diagnòstiques i de monitoratge; c) un maneig que disminueixi la transmissió del virus dins de la granja i l'impacte de la malaltia al final

del procés, i d) el manteniment d'una immunitat suficient i homogènia que redueixi la freqüència d'aparició i virulència dels brots.

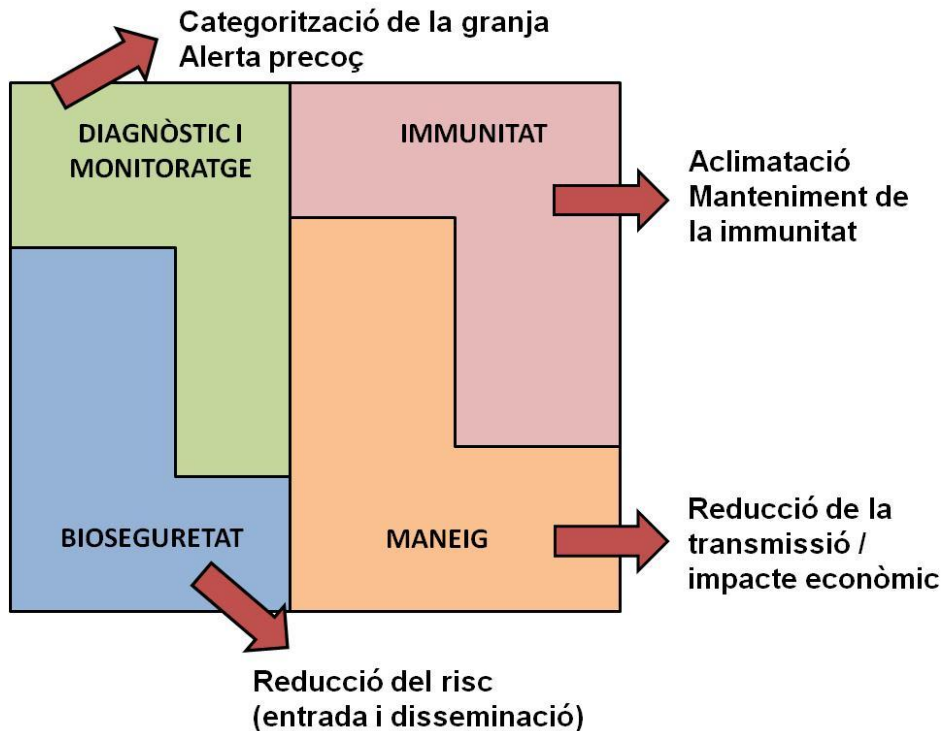


Figura 5. Esquema de les peces clau per al control de la infecció del PRRSV en una granja. Modificat a partir d'una figura cedida pel projecte CONPRRS.

8.1 Bioseguretat

Quan es parla de bioseguretat es fa referència a dos conceptes complementaris, la bioseguretat externa, que evitaria l'entrada del virus al sistema, i la bioseguretat interna, que limitaria la disseminació del virus entre animals i compartiments de la granja. Dins de la bioseguretat externa es trobarien les mesures relatives als animals que afectarien a la reposició, els verros i el semen; el transport, la neteja i desinfecció dels camions i el flux de rutes (Dee *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2013; Thakur *et al.*, 2015); el control del material extern i de les visites (Simon-Grifé *et al.*, 2013); i la proximitat a d'altres granges porcines. Pel que fa a la bioseguretat interna, es basa en el tipus de maneig dels animals, la formació del personal que hi treballa, les instal·lacions de què es disposa i les rutines de diagnòstic i registre (Fablet *et al.*, 2016a).

En primer lloc, serà el tipus de transmissió de les malalties a evitar el que condicionarà les mesures de bioseguretat a aplicar. En segon lloc, les característiques de la granja com la mida, el tipus de producció i la densitat de granges porcines de la zona, s'hauran de tenir en compte a l'hora d'avaluar el risc d'entrada de la malaltia (Bottoms *et al.*, 2013; Fahrion *et al.*, 2014). Per últim, segons l'estructura i els recursos disponibles a nivell de granja i/o regió, caldrà valorar quines mesures de bioseguretat són factibles. Per tant, en funció del risc, l'efectivitat de les mesures i la possibilitat de dur-les a terme, es prioritzaran unes estratègies enfront d'unes altres.

La majoria d'estudis realitzats fins ara es limiten a la descripció de les mesures instaurades en una o més granges i a la pròpia valoració dels grangers i/o veterinaris (Alawneh *et al.*, 2014; Boklund *et al.*, 2004; Casal *et al.*, 2007; Costard *et al.*, 2009; Nöremark *et al.*, 2010; Ribbens *et al.*, 2008; Sahlström *et al.*, 2014; Simon-Grifé *et al.*, 2013). En alguns casos s'intenta valorar el nivell de bioseguretat comparant granges entre sí, tanmateix, no resulta una quantificació precisa ja que és difícil que en dues granges el sol factor de variació sigui la bioseguretat. De fet, l'avaluació de l'eficàcia de les mesures de bioseguretat és difícil, sobretot en absència de brots. Aquests estudis caldria plantejar-los a llarg termini (diversos anys) i des d'una perspectiva poblacional, amb la implicació d'una estructura superior que coordinés i en fes el seguiment.

Una alternativa seria basar l'avaluació de l'eficàcia i la jerarquització de les mesures a prendre fonamentalment en el coneixement acumulat i en l'opinió d'experts (Kuster *et al.*, 2015). Tot i ser una metodologia amb certa subjectivitat, a la pràctica permet fer una anàlisi de risc consensuada per professionals que dona lloc a un rànquing de mesures de bioseguretat que variarà segons la realitat de la regió.

8.2 Diagnòstic i monitoratge

Disposar d'un sistema de categorització de les granges segons el seu estatus enfront el PRRSV és bàsic per a la implementació de programes nacionals i/o regionals pel control i l'eradicació del virus. Existeix una classificació duta a terme per l'Associació americana de veterinaris especialistes en porcí (AASV) i el Departament

d'agricultura dels Estats Units (USDA) recollida en el treball de Holtkamp *et al.* (2011).

La base d'aquesta classificació és el monitoratge de l'excreció i exposició al virus valorats per RT-PCR i ELISA, respectivament:

Granja positiva inestable: positiva en excreció i exposició. Granja amb un brot clínic de PRRS. Detecció del virus en qualsevol teixit. A la pràctica, això s'avalua a través de la detecció d'animals virèmics al deslletament (± 3 dies). També s'inclouen en aquesta categoria les granges de les quals no es disposa informació sobre el seu estat.

Granja positiva estable: l'excreció és incerta i l'exposició positiva. S'assoleix amb quatre RT-PCR negatives realitzades a intervals de 30 dies en els garrins deslletats. No es detecten signes clínics en les reproductores. Aquesta categoria es pot dividir en dues, la subcategoria A, si la granja no ha començat un programa d'eliminació, i la B si ja ho ha fet.

Granja provisionalment negativa: no hi ha excreció en les reproductores i l'exposició és positiva. Es confirma per la negativitat en les anàlisis ELISA realitzades a la reposició negativa després de 60 dies de la seva introducció en el grup de reproductores. A partir d'aquí, si s'escau, cal que les transicions i els engreixos també siguin negatius a ELISA.

Granja negativa: excreció i exposició negatives. L'assoliment d'aquesta categoria depèn de quina estratègia ha seguit la granja per l'eliminació del virus. De totes maneres, cal ELISA negatius en les reproductores durant uns temps que varien segons les estratègies i, en alguns casos, cal complementar aquests resultats amb dades productives.

En les granges amb baixa prevalença com podrien ser les categoritzades com a positives estables B o provisionalment negatives (Holtkamp *et al.*, 2011), cal un monitoratge freqüent i fiable amb el mínim cost possible per tal de veure que no hi ha modificacions en l'estat d'estabilitat.

Duinhof *et al.* (2011) van estudiar la detecció de la circulació del PRRSV en granges endèmiques sense signes clínics des de feia sis mesos. Fruit dels seus resultats van establir que l'anàlisi de 12 mostres de sang, sis en animals de nou setmanes i sis en animals de 16 setmanes, per ELISA i RT-PCR, era suficient per detectar el virus en 8/9 granges infectades. Al mateix temps, van descartar l'ús únic de la serologia ja que, en alguns casos, per sí sola no és suficientment potent. De fet, pel monitoratge en edats menors a sis setmanes o en granges vacunades, l'única tècnica vàlida seria la RT-PCR ja que no es veu influenciada pels anticossos maternals ni vacunals, a més d'una detecció del virus més precoç que la de l'ELISA.

En situacions de baixa prevalença d'animals virèmics en maternitats, la barreja i reagrupament d'aquests animals en els corrals de transició determinarà la transmissió i distribució de la positivitat en la granja. Com a conseqüència, tan el tipus de mostreig utilitzat com la sensibilitat de les proves diagnòstiques tindran un impacte en la detecció del virus.

A més, aquest monitoratge és vàlid per la detecció de la circulació vírica però no ens identifica si la font del virus és fruit d'un flux des de les maternitats o és virus que resta en les transicions (Dee, 2003a). En aquest cas les possibilitats són, o bé sagnar animals dèbils a finals de la lactació (Cano *et al.*, 2009). O bé buidar les transicions, realitzar una neteja i desinfecció acurades, tornar-les a omplir i analitzar els nous garrins.

En el futur, aquestes tècniques i estratègies diagnòstiques pel monitoratge del virus podrien veure's substituïdes per nous mètodes que ofereixin un millor potencial en la detecció del virus, com podrien ser els fluids orals (Prickett *et al.*, 2008b; Prickett and Zimmerman, 2010; Ramirez *et al.*, 2012).

8.3 Maneig

Les estratègies de maneig varien segons si es vol aconseguir l'eradicació i el manteniment d'un estatus negatiu o contràriament, l'objectiu és el mer control de la malaltia. En el cas de rebre reposició d'origen extern, hauria de ser sempre negativa, passar una quarantena de com a mínim 90 dies (Bierk *et al.*, 2001) i un

control diagnòstic tan per PCR com per serologia. En les granges endèmiques l'origen negatiu és important per tal de controlar al màxim l'estat de les reproductores i no introduir noves soques del virus. A més, caldrà realitzar-ne una aclimatació mitjançant vacunació o exposició al virus de la granja.

Una estratègia basada en el maneig diari que pot evitar el despoblament i la vacunació a nivell de garrins en maternitats i transicions és el mètode McREBEL™ (*Management Changes to Reduce Exposure to Bacteria and Eliminates Losses*). Permet controlar i millorar les mortalitats i els pesos abans i després del deslletament, durant i després d'un brot (McCaw, 2000a; 2000b). L'objectiu d'aquest sistema és limitar l'exposició dels garrins infectats per PRRS a bacteries patògenes que són la causa principal de malaltia i mortalitat (Done *et al.*, 1996; Stevenson *et al.*, 1993). Les idees bàsiques són, realitzar les mínimes adopcions possibles, només segons el nombre de mugrons funcionals, en les primeres 24h i prioritant els garrins vigorosos. Minimitzar els tractaments i la manipulació dels garrins i eliminar-ne els malalts. Un maneig tot dins/tot fora estricte tan en maternitats com en transicions, evitant moviments d'animals entre sales i realitzant un correcte buit sanitari (Dee *et al.*, 1993; McCaw, 1995). Finalment, mantenir sempre un flux d'animals unidireccional (Dee and Phillips, 1998)

Pel que fa a l'eradicació del virus, existeixen diverses estratègies. S'ha descrit una tècnica basada en l'anàlisi continu dels animals i l'eliminació dels seropositius. No obstant, a la pràctica no és factible ja que és difícil assegurar-se d'eliminar tots els animals seropositius i els costos diagnòstics i de producció són elevats. A més, les granges on s'ha practicat aquesta tècnica en poc temps han tornat a tenir el virus circulant (Dee *et al.*, 2001; Dee, 2003b).

Una estratègia més radical és el despoblament de la granja, la neteja i desinfecció de les instal·lacions, i la introducció d'animals verges. Aquest mètode és molt efectiu a curt termini però és molt costós. A llarg termini, segons les característiques de la granja, serà més o menys difícil mantenir-se lliure del virus (Corzo *et al.*, 2010).

El tancament de la granja (*herd closure*), combinat amb el despoblament de les transicions (Dee *et al.*, 1997a, 1997b; Dee and Joo, 1994), normalment té un èxit superior al 85%, sempre que les condicions de la granja siguin les adequades: zones de baixa densitat porcina, bona bioseguretat i sistema de producció en tres fases. Es basa en aturar les introduccions almenys durant 6-9 mesos. D'aquesta manera es disminueix el nombre d'animals susceptibles que mantenen la circulació viral. Tot i que el virus pot tardar temps a ser eliminat, a la llarga, si no resten animals susceptibles s'acabarà extingint. Per limitar aquest temps el màxim possible és important que just abans d'implementar la mesura totes les truges hagin entrat en contacte amb el virus, sigui per vacunació o exposició. Un cop els animals són seronegatius, es poden introduir de nou animals verges (Corzo *et al.*, 2010; Torremorell *et al.*, 2003).

Totes aquestes mesures presentades no seran efectives si no són voluntàries i coordinades, tan a nivell de granja com a nivell regional.

8.4 Estat immunitari

Una de les claus per aturar la circulació viral en una granja és la disminució dels animals susceptibles i l'establiment de barreres a la transmissió entre les diferents fases de producció. Per tant, la gestió de la immunitat del ramat és fonamental.

En el cas de reposició externa en una granja infectada, el principal escull és l'aclimatació de la reposició, és a dir, aconseguir desenvolupar en les llavors verges una immunitat activa enfront el virus. Hi ha diverses maneres de fer-ho, com l'exposició de les llavors a material infectat, a d'altres animals virèmics o la inoculació del virus circulant a la granja (Allison, 2003). Els principals problemes d'aquestes estratègies són la manca de control de la infecció i la limitació de la protecció a la soca circulant. L'opció més segura és la vacunació, amb una serologia posterior per comprovar-ne l'estat immunitari assolit abans de l'entrada com a reproductores (Lowe *et al.*, 2006).

Actualment es disposa de dos tipus principals de vacunes, les de virus inactivat (VI) i les de virus atenuat (VA). Les de VI van ser les primeres a desenvolupar-se (Plana-Durán *et al.*, 1997). Aquest tipus de vacunes actuarien a nivell humoral i serien

capaces, en molts casos, d'induir una resposta d'anticossos neutralitzants, sobretot en individus prèviament infectats. Per contra, aquest augment no es traduiria en una reducció proporcional de la virèmia i l'excreció (Nilubol *et al.*, 2004; Vanhee *et al.*, 2009; Zuckermann *et al.*, 2007).

Pel que fa a les VA, serien capaces d'estimular la immunitat cel·lular específica, tot i que els nivells d'eficàcia d'aquesta protecció s'assolirien de forma tardana en la infecció (Meier *et al.*, 2003; Zuckermann *et al.*, 2007).

El nivell de protecció que confereixen ambdós tipus de vacunes és parcial i molt variable entre soques i individus. Alguns autors centren la problemàtica de l'eficàcia d'aquestes vacunes en la variabilitat antigènica del virus resultat de la seva elevada taxa de mutació. Per tant, vacunes més properes a les soques de camp serien més eficaces (Labarque *et al.*, 2004; Meng, 2000; van Woensel *et al.*, 1998a, 1998b). Tot i que, en el fons, l'àmplia diversitat genètica converteix a la pràctica qualsevol exposició al virus en un desafiament heteròleg.

No obstant, altres autors assenyalen que la capacitat d'una vacuna per estimular el sistema immunitari enfront una determinada soca de camp no dependria només de la similitud genètica, ja que vacunes de soques heteròlogues poden presentar millors proteccions que de soques homòlogues o haver-hi una protecció creuada (Díaz *et al.*, 2012b, 2006; Prieto *et al.*, 2008). Com s'ha explicat en l'apartat d'immunitat, a part de la composició antigènica de cada soca, l'exposició i accessibilitat dels epítops de neutralització podria ser un factor a tenir en compte en l'eficàcia de les vacunes (Martínez-Lobo *et al.*, 2011b).

Pel que fa a la seguretat de les VA, existeix la possibilitat de replicació i excreció del virus (Cano *et al.*, 2007; Mengeling *et al.*, 2003b). A més, en femelles gestants la transmissió vertical també és un risc (Dewey *et al.*, 1999). En canvi, les VI són més segures; en truges redueixen els problemes reproductius si el desafiament és homòleg (Plana-Durán *et al.*, 1997), però tenen un escàs efecte quan es tracta d'una soca heteròloga (Scotti *et al.*, 2007).

D'acord amb les característiques exposades de cada tipus de vacuna, el protocol més eficaç seria una primera vacunació de les truges o llavors no gestants amb VA, i posteriors revacunacions amb VI 2 o 3 cops a l'any (Díaz *et al.*, 2013; Nilubol *et al.*, 2007).

En garrins, en condicions experimentals, s'ha demostrat que amb el PRRSV1, els animals vacunats amb VA tarden més temps a infectar-se, 7 dies ($CI_{95\%}= 5.2-8.7$) els no vacunats i 21 dies ($CI_{95\%}= 14.1-27.9$) els vacunats. Presenten simptomatologies més lleus i virèmies més curtes (12.2 ± 4 dies en no vacunats i 3.7 ± 3.4 dies en vacunats) i s'alenteix la transmissió, $R_0=2.78$ ($CI_{95\%}= 2.13-3.43$) en no vacunats i $R_0=0.53$ ($CI_{95\%}= 0.19-0.76$) en vacunats (Pileri *et al.*, 2015). A partir d'aquests resultats es podria plantejar la vacunació en llençol com una possible estratègia per l'eliminació del virus en una granja. Cal tenir en compte però, que en vacunacions a edats molt joves (3 setmanes d'edat), l'eficàcia de la vacuna es pot veure disminuïda per la interacció amb els anticossos maternals (Fablet *et al.*, 2016b).

9. Els fluids orals

Els fluids orals (FO) són una mostra diagnòstica de fàcil mostreig i baix cost. A més, la seva obtenció no és agressiva ni estressant pels animals. Aquestes són les principals raons perquè en els últims anys hagi crescut l'interès per aquest tipus de mostra com a eina diagnòstica en virus, bacteries i malalties sistèmiques.

9.1 Composició dels fluids orals

La saliva és el fluid secretat per les glàndules salivals. Està composta en un 99.5 % per aigua, en un 0.3 % per proteïnes (principalment glicoproteïnes, enzims, immunoglobulines i pèptids amb activitat antimicrobiana), i en un 0.2% per substàncies inorgàniques, fonamentalment ions (Schipper *et al.*, 2007). Els FO a més de saliva també contenen transsudacions mucoses, secrecions bronquials i nasals, derivats del sèrum i la sang com hormones o anticossos, bacteries, virus i fongs, cèl·lules epitelials i altres components cel·lulars i restes de menjar (Greabu *et al.*, 2009). Les substàncies derivades de la sang poden arribar per diferents vies: per

difusió passiva o per transport actiu des de les cèl·lules de la cavitat oral; pel pas entre les junçons cel·lulars o per transsudació a través de l'epiteli d'unió entre la geniva i les dents (el solc *crevicular*) (Chiappin *et al.*, 2007). Per tant, els patògens detectats en els FO poden tenir un origen local i/o sistèmic.

S'ha demostrat que el PRRSV es pot detectar en els FO durant i després de la virèmia (Decorte *et al.*, 2015; Kittawornrat *et al.*, 2010). A més, el virus persisteix en els òrgans limfoides com la tonsil·la durant un llarg període de temps (Bierk *et al.*, 2001; Horter *et al.*, 2002; Wills *et al.*, 2003). A partir d'aquestes dues evidències es podria establir la hipòtesi que el virus present en els FO durant la virèmia provindria tant del sistema circulatori com dels òrgans limfoides però en canvi, un cop superada aquesta fase, el virus detectat en els FO provindria dels òrgans limfoides pròxims a la cavitat oral. Si això fos cert, els FO serien una eina molt útil per al diagnòstic d'animals infectats de llarga durada.

9.2 L'ús dels fluids orals com a eina diagnòstica

La primera malaltia diagnosticada en humans utilitzant els FO fou la febre de Malta. El 1909 Pollaci i Ceraulo van demostrar la presència d'anticossos contra la bactèria *Brucella melitensis* en FO de malalts ja diagnosticats (citats per Prickett and Zimmerman, 2010). Tanmateix no va ser fins el 1986, quan Archibald *et al.* (1986) van detectar anticossos en FO contra el *Virus de la immunodeficiència humana* (VIH). Aquest mètode permetia diagnosticar un gran nombre de persones de manera ràpida, incruenta, segura i amb un menor cost que l'extracció de sang. Finalment, el 1994 la *US Food and Drug Administration* (FDA) va aprovar el primer *kit* de FO per la detecció d'anticossos contra el HIV⁹. Els FO es van convertir en una mostra molt útil en campanyes de vigilància epidemiològica com la del VIH i altres agents infecciosos on calia un mostreig a gran escala, barat, fàcil i ràpid (Holm-Hansen *et al.*, 2007; Nokes *et al.*, 2001; Ramsay *et al.*, 1997).

En el camp de la sanitat animal, els veterinaris de cavalls van ser els primers en utilitzar aquest tipus de mostra per a proves antidopatge en cavalls de carreres, sota recomanació de la *National Association of State Racing Commissioners*

⁹ Font: <https://aidsinfo.nih.gov/news/267/approval-of-the-first-u-s--hiv-test-system-using-oral-fluid-samples>, darrera consulta el 24/10/2016

(Williams and Stone, 1941). El problema però, era l'escassa quantitat de mostra obtinguda, i això els va dur a perfeccionar-ne la tècnica de mostreig i a estudiar en profunditat la detecció de drogues en FO (Horner, 1976).

Més recentment, en els bòvids s'han realitzat estudis epidemiològics de *Salmonella* i *Escherichia coli* a partir de cordes en vedells d'engreix (Smith *et al.*, 2005, 2004; Stanford *et al.*, 2005). No obstant, la malaltia amb què s'ha treballat més és la detecció d'anticossos en FO contra el virus de la febre aftosa (Archetti *et al.*, 1995; Figueroa *et al.*, 1973; Parida *et al.*, 2006).

En els gats, els FO s'utilitzen per la detecció d'anticossos contra el *Virus de la leucèmia felina* (FeLV) (Gomes-Keller *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 1987), i el *Virus de la immunodeficiència felina* (FIV) (Matteucci *et al.*, 1993; Poli *et al.*, 1992). En gossos, l'ús principal dels FO ha estat l'estudi de l'excreció del *Virus de la ràbia* per la saliva (Fekadu *et al.*, 1982). Fins i tot s'ha ideat una prova diagnòstica basada en la saliva com alternativa a l'anàlisi dels cervells de gossos infectats (Kasempimolporn *et al.*, 2000).

Pel que fa al porcí, el primer article sobre la detecció d'anticossos en FO tracta del *Virus de la pesta porcina clàssica* (PPC) i data del 1977 (Corthier and Aynaud, 1977). Posteriorment, també es va demostrar la presència d'anticossos enfront d'*E. coli* i el *Virus de la gastroenteritis transmissible porcina* (TGEV) en les glàndules salivals (De Buysscher and Dubois, 1978; DeBuysscher and Berman, 1980); així com la detecció d'IgA enfront d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) en la saliva i rentats broncoalveolars (Loftager *et al.*, 1993).

9.3 Els fluids orals en el diagnòstic del PRRSV

El 1997 investigadors del *Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine* (VDPAM) de la Universitat Estatal d'Iowa van aconseguir aïllar el virus del PRRS en els FO (Wills *et al.*, 1997b). Els FO es van identificar com una via més d'excreció del virus i una possible eina diagnòstica a investigar. La idea es basa en aprofitar el comportament d'exploració inherent als suïds per recollir-ne els FO amb una corda de cotó penjada als corrals. En un primer estudi experimental es van detectar

anticossos i virus en quantitat suficient pel diagnòstic en animals de 4, 8 i 12 setmanes (Prickett *et al.*, 2008a). En un segon estudi, es van validar aquests resultats en transicions i engreixos de granges comercials (Prickett *et al.*, 2008b). Posteriorment, es va estudiar la detecció del PRRSV en FO a nivell individual en verros per establir una correlació entre la detecció en sèrum i FO (Kittawornrat *et al.*, 2010).

Finalment, el febrer del 2010 el *Veterinary Diagnostic Laboratory* (VDL) de la Universitat Estatal d'Iowa va començar a oferir l'anàlisi de FO per la detecció del PRRSV com un servei diagnòstic de rutina. En poc temps, la demanda d'anàlisis de FO va créixer exponencialment, passant de 10.000 el 2010 a més de 175.000 el 2015¹⁰. En el camp de la recerca s'ha continuat optimitzant la detecció del virus per qRT-PCR (Chittick *et al.*, 2011; Decorte *et al.*, 2013) i els seus anticossos a partir de la modificació d'un *kit* ELISA comercial adaptat a la matriu de FO (Kittawornrat *et al.*, 2012a, 2012b). Així com la millora de la recollida en granja i el processament al laboratori (Olsen *et al.*, 2013a).

9.4 Límits dels FO

Actualment, la detecció del PRRSV en FO per qRT-PCR s'utilitza rutinàriament com a instrument diagnòstic pel monitoratge de granges endèmiques, sobretot als EUA. Tanmateix, tot i els estudis realitzats fins ara, els límits d'aquesta tècnica encara no s'han establert clarament. Existeixen diversos factors que podrien actuar disminuint la sensibilitat de la tècnica, distribuïts des de la granja a l'obtenció dels resultats.

¹⁰ Font: <https://vetmed.iastate.edu/story/oral-fluids>, darrera consulta el 24/10/2016

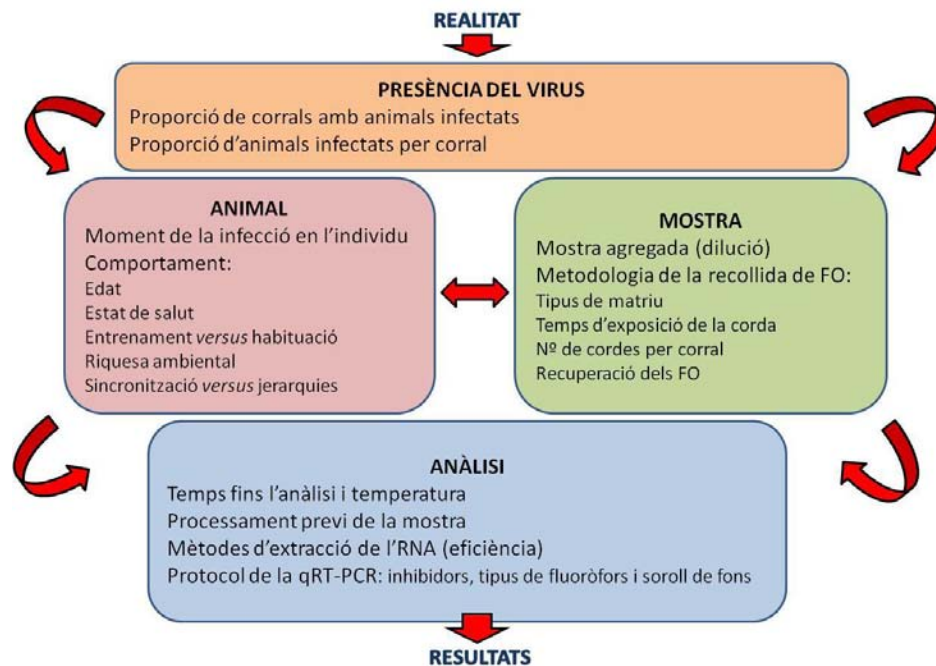


Figura 6. Possibles factors que poden causar una pèrdua de sensibilitat en la detecció del PRRSV en FO per qRT-PCR.

9.4.1 Proporció de corrals infectats per nau

La capacitat de detectar un corral positiu en una granja endèmica de PRRSV dependrà en primer lloc de la prevalença de corrals infectats en la granja a mostrejar (naus de transició, per exemple). Aquesta prevalença condicionarà la probabilitat d'escollir un corral infectat per a penjar-hi la corda. Per tant, per establir una estratègia de mostreig dels FO es plantegen tres problemes principals: quina és la prevalença mínima que ens permetria detectar el virus mostrejant n corrals, i quins corrals i amb quina freqüència mostrejar-los.

En la web del *College of Veterinary Medicine* de la Universitat Estatal d'Iowa hi ha publicades diverses recomanacions pel monitoratge de patògens porcins utilitzant els FO¹¹. Els estudis en què es basen aquestes recomanacions estableixen uns protocols aproximats de recollida, com el mostreig de diferents corrals espaiats dins de la nau a intervals de dues setmanes, o aspectes més pràctics (Hoffmann *et al.*, 2008; Prickett *et al.*, 2008). Ramirez *et al.* (2012) per la seva banda, van mostrar que

¹¹ Font: <https://vetmed.iastate.edu/vdpam/research/disease-topics/swine/oral-fluids>, darrera consulta el 24/10/2016

la detecció del virus mitjançant FO podia variar molt entre naus d'un mateix sistema productiu, tant en el nombre de corrals detectats com en la durada de l'excreció.

Cal tenir en compte però, que en aquests estudis els protocols de recollida de FO per la detecció del PRRSV a nivell de corral no queden validats, ja que no es coneix ni la prevalença inicial del virus en les naus, ni s'estableix clarament el límit de detecció del mostreig.

9.4.2 Proporció d'animals infectats per corral

Pel que fa a la prevalença per corral, com més animals positius, més probabilitat d'identificar el corral com a positiu. Olsen *et al.* (2013b) van modelitzar mitjançant una regressió logística la probabilitat de detectar el PRRSV en FO per qRT-PCR segons la prevalença dins del corral. Les prevalences es van establir experimentalment introduint un nombre determinat d'animals vacunats amb VA en els corrals. En baixes prevalences (10%, 2-3 animals de 25), la probabilitat de detectar el corral com a positiu fou del 50%. En prevalences del 20% (5 animals de 25), la probabilitat augmentava fins situar-se en el 70%. Per arribar a probabilitats del 90% les prevalences havien de ser del voltant del 36%.

9.4.3 Mostra agregada

Una possible explicació d'aquesta pèrdua de sensibilitat en baixes prevalences seria l'efecte de dilució inherent a aquest tipus de mostra quan es recull a nivell de corral. El virus excretat per 2-3 animals infectats en un corral de 25 quedaria diluït en el volum de saliva aportat per la resta del grup.

Els FO no individuals es consideren una mostra agregada, és a dir, una única mostra agafada en un moment i lloc determinats que representa una composició present en aquell moment i lloc. Per tant, aquest tipus de mostra està composta per FO de diferents individus, en proporcions variables, d'un moment i un lloc determinats on la unitat experimental és el corral i no l'individu.

Aquesta naturalesa de la mostra té característiques favorables i desfavorables per la sensibilitat de la tècnica. Una avantatge és que permet el mostreig d'un grup nombrós d'animals de manera fàcil, ràpida i respectuosa amb el benestar de

l'animal. Per contra, com s'ha comentat, en ser un conjunt de molts FO, pot existir un efecte de dilució si la càrrega viral del corral és baixa.

9.4.4 Metodologia de la recollida de FO

Tipus de matriu

Per l'optimització de la recollida de FO cal una matriu que presenti tres característiques essencials: atreure els animals, alta capacitat de retenció de líquid i no interferir en les anàlisis posteriors.

El material ha de poder ser manipulat, ingerit, mastegat, deformat i destruït pels animals. I a més, certes olors també estimulen la conducta exploratòria dels porcs (Van de Weerd *et al.*, 2003). Les cordes orgàniques de cotó utilitzades per la recollida de FO compleixen la majoria d'aquestes propietats.

Un cop els animals hi interactuen el material hauria de ser capaç d'absorbir un volum mínim. Segons l'estudi de Decorte *et al.* (2014), tan el cotó com el cànem, la poliamida i el polièster són materials capaços de retenir volums adequats quan es presenten en forma de cordes. Per una altra banda, existeixen dispositius provinents de la medicina humana utilitzats per a la recollida de FO a nivell individual com el Salivette® (Sarstedt AG & Co.). No obstant, segons la nostra experiència, el Salivette® té una capacitat de retenció limitada (2 ml). Una altra opció utilitzada en alguns estudis de biomarcadors i amb un nivell de retenció millor serien les esponges (Escribano *et al.*, 2014; Fuentes *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2009).

L'efecte que pot produir el material utilitzat per la recollida de FO en la detecció del virus per qRT-PCR no està clar. No obstant, tan en l'estudi d'Olsen *et al.* (2013a) amb el PRRSV2, com en el de Decorte *et al.* (2015) amb el PRRSV1, la detecció del virus en el cotó no tractat és millor que en el cànem, el niló o el polièster.

Temps d'exposició de la corda

El nombre d'animals i la quantitat de FO amb què cadascun d'ells contribuïran a la mostra depèn, a part d'altres factors, del temps d'exposició de la corda. Seddon *et al.* (2012) van establir que quan es penja una corda durant 60 minuts en un corral

de transició amb ≤ 25 animals, més del 80% dels porcs hi entren en contacte, interactuant-hi el 95% d'ells durant ≥ 20 segons. En el mateix estudi, van demostrar que la proporció d'animals que contacten amb la corda no es reparteix de manera uniforme en el temps, sinó que l'augment més important té lloc en els primers 15 minuts d'exposició de la corda (0-82.3%). Dels 15 als 30 minuts i dels 30 als 45, també es va produir un augment significatiu però molt menor, [82.3-88.1% \pm 2.3; $P < 0.001$] i [88.1-90.1% \pm 2.4; $P < 0.01$] respectivament. A més de la proporció d'animals també va incrementar el temps de contacte per porc. En canvi, dels 45 als 60 minuts la proporció d'animals ja no va augmentar significativament. Aquestes dades són similars a les obtingudes per White *et al.* (2014) en corrals de transició de 25 a 28 animals on als 30 minuts el 75.5% dels porcs amb un contacte previ amb la corda havien interactuat amb ella. Per tant, i segons aquests dos estudis, una corda penjada 30 minuts no recolliria els FO del 12-24.5% dels animals. I, tot i que deixéssim la corda el doble de temps, encara restaria un 10% dels animals que no contactarien amb ella.

Nombre de cordes per corral

Un altre factor que pot condicionar la contribució de cada animal a la mostra és el nombre de cordes penjades al corral. En sistemes d'*slats*, incrementar el nombre de cordes presentades en un corral de ≤ 25 animals d'una a dues, augmenta el temps de contacte per animal, i per tant la contribució de cada individu i el total de FO recollits (Seddon *et al.*, 2012).

Recuperació dels FO

A la pràctica, el mètode més utilitzat per la recuperació dels FO és a mà en la mateixa granja. Tot i que habitualment s'obté una quantitat suficient per les anàlisis diagnòstiques, Seddon *et al.* (2012) van demostrar que hi havia diferències significatives en la recuperació dels FO a mà (12.6 \pm 1.6 ml) o per centrifugació (26.8 \pm 1.6 ml) ($P < 0.001$). Aquesta diferència pot ser important en determinades situacions com ara la recol·lecció a nivell individual, en animals molt joves, poc habituats o en experimentals on calgui obtenir un gran volum de mostra.

9.4.5 Moment de la infecció dels animals

Segons la càrrega viral dels animals excretors presents en un corral, la probabilitat de detectar-lo com a positiu podrà variar. A més, el començament i la durada de l'excreció també dependrà de la soca del virus, ja que en un estudi amb PRRSV1 es va detectar abans en sèrum que en FO (Decorte *et al.*, 2015), en canvi, amb altres soques de PRRSV1 i PRRSV2, Kittawornrat *et al.* (2010) van detectar el virus al mateix temps en FO i en sèrum. Malgrat això, els dos estudis coincideixen en assenyalar que l'excreció per FO, segons l'individu i la soca, té una durada més llarga que la virèmia. Seria interessant valorar fins on pot arribar aquesta excreció ja que podria jugar un paper rellevant en la transmissió del virus en etapes tardanes de la infecció (Bierk *et al.*, 2001; Horter *et al.*, 2002).

9.4.6 Comportament dels animals

Per la detecció del PRRSV en FO el més important no seria la quantitat de saliva recollida, ja que normalment s'arriba al mínim diagnòstic (Kittawornrat *et al.*, 2010; Seddon *et al.*, 2012), sinó quins són els animals que participen en la composició de la mostra i en quina proporció. Els FO són el resultat d'una aportació *voluntària* dels animals basada en el comportament d'exploració innat dels suïds (Day *et al.*, 1995). Per tant, tot i que no existeixen gaires treballs sobre la influència del comportament porcí en la recollida de FO, aquest factor hi podria jugar un paper molt important.

Edat dels animals

En un estudi de comportament van estudiar la interacció de porcs de diferents edats amb diversos objectes, entre ells les cordes. En primer lloc van observar que no hi havia diferències entre sexes a l'hora d'interactuar amb els objectes. Pel que fa a l'edat, els animals de 13 setmanes tardaven menys temps en entrar en contacte amb les cordes presentades que els de 5 i 3 setmanes. Per una altra banda, els més petits es cansaven més ràpid i hi interactuaven menys temps (Docking *et al.*, 2008). Basant-nos en la pròpia experiència, podríem afirmar que abans de les 4 setmanes d'edat l'activitat dels garrins és molt reduïda i la seva capacitat de salivació i amaratge de la corda és limitada.

Estat sanitari

Per una altra banda, seria lògic pensar que un animal malalt, sobretot en la fase aguda de la infecció, no contribuirà amb els seus FO de la mateixa manera que la resta. Decorte *et al.* (2015) i Kittawornrat *et al.* (2010) van estudiar l'efecte de la infecció del PRRS en relació a l'obtenció de FO, el primer en garrins de 8 setmanes i el segon en verros, allotjats individualment i inoculats amb PRRSV1 i PRRSV2, respectivament. El nombre de mostres recollides no es va veure afectat per la infecció de PRRS, en canvi, en el segon estudi sí que van detectar diferències significatives en el volum de la mostra, sent més important abans de la inoculació. Cal tenir en compte també, que aquests estudis es van dur a terme en animals allotjats individualment i amb unes soques de PRRSV concretes. El resultat podria ser diferent amb soques més virulentes o en analitzar corrals de 20-25 animals (transició o engreix).

Entrenament versus habituació

La proporció d'animals que interactuen amb la corda és més gran en corrals amb animals que ja hi han estat en contacte. A més, en aquests casos, també tarden menys temps en fer-ho. Als 30 minuts el 75.5% dels porcs amb un contacte previ havien interactuat amb la corda; en canvi en el mateix temps, animals sense contacte previ ho van fer el 54.4%. A més, existeix una adaptació progressiva a la corda, és a dir, quan es sotmet un corral a exposicions consecutives de la corda, cada cop hi ha més animals que s'hi acosten en menys temps (White *et al.*, 2014).

Cal tenir en compte però, que l'interès per l'objecte també va lligat a la durada i interval entre exposicions, és a dir, un objecte nou els desperta curiositat i els incentiva el comportament d'exploració. Però si aquell objecte és permanent o molt habitual, s'hi acostumen i hi perden interès (Gifford *et al.*, 2007; Trickett *et al.*, 2009).

Riquesa ambiental

Un altre factor que condiciona aquest interès en l'objecte introduït és l'ambient en el què viuen els animals. Ambients que estimulen el comportament d'exploració del porc, com corrals amb palla, són poc propicis per penjar-hi cordes ja que el nivell de

motivació per acostar-s'hi és molt menor que en sistemes d'*slats* (Seddon *et al.*, 2012).

Sincronització versus jerarquies

Els porcs són animals adaptats a viure en comunitat i per això mostren comportaments individuals lligats al grup. Un d'aquests comportaments és el de sincronització, és a dir, quan s'introdueix un element nou en el corral l'interès despertat en un primer animal desperta el de la resta (Docking *et al.*, 2008).

Contràriament, possibles comportaments de dominància es traduirien en què els animals més grans i forts arribarien millor a la corda i en dificultarien l'accés als més febles. En l'estudi de Seddon *et al.* (2012) van intentar mesurar la dominància, però no van trobar cap relació entre el pes dels animals i el temps de contacte amb la corda. Tanmateix, podria ser que en aquest cas, el pes no fos un indicador adequat per determinar la dominància entre porcs.

9.4.7 Temps i temperatura fins l'anàlisi

En la majoria de casos aquest tipus de mostra està altament contaminada, ja sigui per restes de menjar, femta o detritus presents a la boca dels animals o en el seu ambient. Per una altra banda, l'RNA del PRRSV és de cadena simple, per tant molt làbil. Per tant, la proliferació de bacteries el podrien degradar ràpidament (Jacobs *et al.*, 2010; Schipper *et al.*, 2007).

Prickett *et al.* (2009) van demostrar que, sempre que es mantingués la cadena del fred, l'ús d'antimicrobians no era necessari. Fins i tot, si la mostra es mantenia per sota dels 20°C, el tractament era contraproductiu per a l'òptima detecció de l'RNA víric. Tampoc van detectar diferències entre conservar la mostra congelada a -20°C o mantenir-la a ≤10°C durant 12 dies. No obstant, caldria comprovar si les diferències entre aquests tractaments tampoc es farien paleses en concentracions més properes a les de camp, ja que els FO utilitzats contenien 1×10^{12} còpies d'RNA/mL. Un altre mètode provat per la conservació de la mostra amb resultats positius és l'*Oragene RNA*, un estabilitzador de la saliva que redueix la degradació de l'RNA del PRRSV quan les mostres es mantenen a temperatura ambient (Decorte

et al., 2013). Malgrat aquests estudis, encara no s'ha definit, en condicions de manteniment de la cadena del fred i dins del context del funcionament habitual d'un laboratori de diagnòstic, quin és el límit de temps on l'RNA comença a degradar-se en els FO.

9.4.8 Processament previ de la mostra

No existeix un protocol universal en la preparació dels FO abans de la seva anàlisi. La presència de detritus i altres molècules pot interferir en algunes tècniques analítiques, per això alguns autors en proposen la centrifugació i l'anàlisi del sobrenedant recuperat. Aquesta clarificació de la mostra també en disminueix la viscositat i en fa més fàcil el seu maneig (Schipper *et al.*, 2007). Una altra opció per a millorar-ne la viscositat evitant la centrifugació seria deixar les mostres de FO a 4°C tota una nit per a què les partícules grans es dipositin al fons (Romagosa *et al.*, 2012).

El possible escull plantejat en aquests mètodes de clarificació és que aquesta separació física pugui dur a la pèrdua de càrrega viral degut a l'adhesió dels virions a partícules de gran mida arrossegades al fons del tub. No s'ha trobat cap estudi que demostrï si la centrifugació millora o entorpeix la detecció del PRRSV en FO. Olsen *et al.* (2013a) van demostrar una millor detecció dels anticossos enfront del PRRSV per ELISA en mostres no processades; en canvi, només van poder dur a terme la seroneutralització amb les mostres processades (centrifugació a 10,000 g durant 2h seguida de filtració amb 0.22 µm de diàmetre). Pel que fa a la detecció del virus per qRT-PCR no van poder comparar els dos tractaments per manca de mostra.

9.4.9 Mètodes d'extracció de l'RNA (eficiència)

La pèrdua d'eficiència en les anàlisis per PCR es relaciona sovint amb la presència d'inhibidors en l'eluït de l'extracció d'RNA, és a dir, de substàncies que tenen un efecte negatiu en la reacció. En una matriu tan complexa com són els FO de porcs, els inhibidors possibles són un grup heterogeni de substàncies, des de compostos presents en la mateixa saliva (Ochert *et al.*, 1994), polisacàrids complexos presents en la femta (Das *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 1997), restes cel·lulars, altres RNA o DNA, cations com calci o ferro, restes de menjar o mucina, fins compostos lligats a

la mateixa extracció de l'RNA (Al-Soud *et al.*, 2005; Rossen *et al.*, 1992). Els inhibidors poden actuar en les diferents fases del procés, des de l'extracció fins a les diferents parts de la reacció de la qRT-PCR (Schrader *et al.*, 2012; Wilson, 1997).

En conseqüència, l'objectiu principal de la fase d'extracció seria obtenir la major quantitat de material genètic diana amb la menor quantitat d'inhibidors possible. Les extraccions on s'utilitza el tiocianat de guanidina són capaces d'eliminar més eficientment els inhibidors que d'altres (Hale *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1995). Dins d'aquestes, tan els mètodes basats en el pas de la mostra per columnes de sílice com els que utilitzen boles magnètiques per separar el material genètic en solen eliminar un ampli ventall (Kemp *et al.*, 2006; Maher *et al.*, 2001).

En tots aquests sistemes d'extracció hi ha un pas final on es precipita i concentra l'RNA, així com els inhibidors que hi puguin quedar (Chittick, 2012). Per això en alguns protocols, per disminuir-ne l'efecte es recomana la dilució de la mostra o dels àcids nucleics extrets. L'inconvenient és que llavors també es dilueix la mostra i es perd sensibilitat. Una altra estratègia seria augmentar la quantitat de mostra per obtenir més concentració d'àcids nucleics en l'elució, però en aquest cas també incrementarien els inhibidors (Schrader *et al.*, 2012).

No es coneix exactament quins són els inhibidors presents en els FO i per quins mecanismes actuen, per tant és molt difícil establir un protocol que permeti eliminar-los completament. L'alternativa seria valorar l'efecte d'aquests possibles inhibidors. Per fer-ho es poden utilitzar les eficiències de la qRT-PCR que són indicadores de la puresa de l'RNA obtingut amb un determinat mètode d'extracció.

9.4.10 Protocol de la qRT-PCR

Els inhibidors que no han estat eliminats en l'extracció de l'RNA poden actuar en les diferents reaccions enzimàtiques que tenen lloc durant una qRT-PCR: poden inhibir-ne la transcripció inversa, degradar o modificar el cDNA produït, dificultar la unió dels encebadors; degradar, inhibir o alterar la DNA polimerasa i interferir en la unió de la sonda o en la seva fluorescència (Schrader *et al.*, 2012; Wilson, 1997). Per tant, una opció per reduir-ne l'efecte seria, d'alguna manera, augmentar la robustesa dels enzims, per exemple doblant-ne la quantitat (Chittick *et al.*, 2011).

De la mateixa manera, com més específics siguin els encebadors, més robusta serà la qRT-PCR i menor serà l'efecte dels inhibidors. A la pràctica però, degut a la taxa de mutació del virus, és difícil arribar al 100% d'especificitat entre les soques víriques circulants al camp i els encebadors disponibles al laboratori.

Per una altra banda, la detecció de la mostra en la qRT-PCR es basa en la fluorescència emesa per una sonda quan és fragmentada per l'activitat exonucleasa 5' de la Taq polimerasa. En aquest sentit, la presència d'inhibidors podria disminuir la sensibilitat de la qRT-PCR augmentant el soroll de fons de la tècnica i per tant, fent que al fluoròfor li calgués un senyal més potent per distingir-se i ser detectat pel sensor del termociclador (Kreuzer *et al.*, 2000).

L'ús de controls d'amplificació, externs i/o interns, competitiu o no competitiu, permet detectar les inhibicions importants, tot i que no són capaços de detectar inhibicions més subtils (Hofmann, 2003; Hoorfar *et al.*, 2003; Nolan *et al.*, 2006; Villanova *et al.*, 2007).

BIBLIOGRAFIA INTRODUCCIÓ

- Al-Soud, W.A., Ouis, I.-S., Li, D.-Q., Ljungh, S., Wadström, T., 2005. Characterization of the PCR inhibitory effect of bile to optimize real-time PCR detection of *Helicobacter* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44, 177–82.
- Alawneh, J.I., Barnes, T.S., Parke, C., Lapuz, E., David, E., Basinang, V., Baluyut, A., Villar, E., Lopez, E.L., Blackall, P.J., 2014. Description of the pig production systems, biosecurity practices and herd health providers in two provinces with high swine density in the Philippines. *Prev. Vet. Med.* 114, 73–87.
- Albina, E., Carrat, C., Charley, B., 1998. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 18, 485–90.
- Albina, E., Piriou, L., Hutet, E., Cariolet, R., L'Hospitalier, R., 1998. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 49–66.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S., 2000. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch. Virol.* 145, 2421–9.
- Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A., 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J. Virol.* 74, 10834–10837.
- Allison, G., 2003. Control using oropharyngeal scraping inoculation., in: Zimmerman, J. J., Yoon, K., Neumann, E. (Ed.), *PRRS Compendium*. National Pork Board, Pork Checkoff, pp. 103–104.
- An, T., Zhou, Y., Liu, G., Tian, Z., Li, J., Qiu, H., Tong, G., 2007. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of PRRSV isolates in mainland China from 1996 to 2006: coexistence of two NA-subgenotypes with great diversity. *Vet. Microbiol.* 123, 43–52.
- Ansari, I.H., Kwon, B., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2006. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J. Virol.* 80, 3994–4004.
- Archetti, I.L., Amadori, M., Donn, A., Salt, J., Lodetti, E., 1995. Detection of foot-and-mouth disease virus-infected cattle by assessment of antibody response in oropharyngeal fluids. *J. Clin. Microbiol.* 33, 79–84.
- Archibald, D.W., Zon, L., Groopman, J.E., McLane, M.F., Essex, M., 1986. Antibodies to human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III) in saliva of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients and in persons at risk for AIDS. *Blood* 67, 831–4.
- Balka, G., Hornyák, Á., Bálint, Á., Benyeda, Z., Rusvai, M., 2009. Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol. Methods* 158, 41–45.
- Balka, G., Hornyák, Á., Dán, Á., Ladinig, A., Biksi, I., Rusvai, M., 2010. PriProET based melting point analyses on PRRSV positive field samples. *Mol. Cell. Probes* 24, 411–414.
- Balka, G., Wang, X., Olasz, F., Bálint, Á., Kiss, I., Bányai, K., Rusvai, M., Stadejek, T., Marthaler, D., Murtaugh, M.P., Zádori, Z., 2015. Full genome sequence analysis of a wild, non-MLV-related

- type 2 Hungarian PRRSV variant isolated in Europe. *Virus Res.* 200, 1–8.
- Baumann, A., Mateu, E., Murtaugh, M.P., Summerfield, A., 2013. Impact of genotype 1 and 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses on interferon- α responses by plasmacytoid dendritic cells. *Vet. Res.* 44, 33.
- Bautista, E.M., Goyal, S.M., Yoon, I.J., Joo, H.S., Collins, J.E., 1993. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 163–5.
- Bautista, E.M., Molitor, T.W., 1997. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol.* 10, 83–94.
- Bautista, E.M., Molitor, T.W., 1999. IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. *Arch. Virol.* 144, 1191–200.
- Benfield, D.A., Nelson, E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D., Chladek, D., 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 127–33.
- Benfield, D., Nelson, C., Steffen, M., Rowland, R., 2000. Transmission of PRRSV by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV, in: *Proceedings of the 31st Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners.* Indianapolis, Indiana, pp. 405–407.
- Benson, J.E., Yaeger, M.J., Christopher-Hennings, J., Lager, K., Yoon, K.-J., 2002. A comparison of virus isolation, immunohistochemistry, fetal serology, and reverse-transcription polymerase chain reaction assay for the identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transplacental infection in the fetus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 8–14.
- Beura, L.K., Sarkar, S.N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J. Virol.* 84, 1574–84.
- Bierk, M.D., Dee, S.A., Rossow, K.D., Otake, S., Collins, J.E., Molitor, T.W., 2001. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can. J. Vet. Res.* 65, 261–266.
- Bilodeau, R., Archambault, D., Vézina, S.A., Sauvageau, R., Fournier, M., Dea, S., 1994. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in a swine operation. *Can. J. Vet. Res.* 58, 291–8.
- Boklund, A., Alban, L., Mortensen, S., Houe, H., 2004. Biosecurity in 116 Danish fattening swineherds: descriptive results and factor analysis. *Prev. Vet. Med.* 66, 49–62.
- Bøtner, A., Strandbygaard, B., Sørensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S., Alexandersen, S., 1997. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.* 141, 497–9.
- Bottoms, K., Poljak, Z., Friendship, R., Deardon, R., Alsop, J., Dewey, C., 2013. An assessment of external biosecurity on Southern Ontario swine farms and its application to surveillance on a geographic level. *Can. J. Vet. Res.* 77, 241–53.
- Brar, M.S., Shi, M., Murtaugh, M.P., Leung, F.C., 2015. Evolutionary diversification of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 96, 1570–1580.
- Brockmeier, S.L., Palmer, M.V., Bolin, S.R., 2000. 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.* 61, 892–9.
- Brockmeier, S.L., Lager, K.M., 2002. Experimental airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Microbiol.* 89, 267–275.
- Brown, E., Lawson, S., Welbon, C., Gnanandarajah, J., Li, J., Murtaugh, M.P., Nelson, E.A., Molina, R.M., Zimmerman, J.J., Rowland, R.R.R., Fang, Y., 2009. Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 628–35.
- Buddaert, W., Van Reeth, K., Pensaert, M., 1998. In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 461–7.
- Burgara-Estrella, A., Díaz, I., Rodríguez-Gómez, I., Essler, S., Hernández, J., Mateu, E., 2013. Predicted Peptides from Non-Structural Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Are Able to Induce IFN- γ and IL-10. *Viruses* 5, 663–677.
- Bustin, S.A. et al., 2004. A-Z of Quantitative PCR. International University Line, CA, USA.
- Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., Welch, S.-K.W., 2007. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Virol.* 81, 7371–9.
- Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W., Husmann, R., Zuckermann, F.A., 2010. Characterization of the cytokine and maturation responses of pure populations of porcine plasmacytoid dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptor agonists. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 20–33.
- Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W.M., Husmann, R.J., Zuckermann, F.A., 2011. North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses inhibit type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* 85, 2703–13.
- Cano, J.P., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Pijoan, C., 2007. Impact of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine intervention on a population of pigs infected with a heterologous isolate. *Vaccine* 25, 4382–91.
- Cano, J.P., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Rovira, A., Morrison, R.B., 2009. Infection dynamics and clinical manifestations following experimental inoculation of gilts at 90 days of gestation with a low dose of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 73, 303–7.
- Carman, S., Sanford, S.E., Dea, S., 1995. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario--1978 to 1982. *Can. Vet. J.* 36, 776–7.
- Casal, J., De Manuel, A., Mateu, E., Martín, M., 2007. Biosecurity measures on swine farms in Spain: Perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures. *Prev. Vet. Med.* 82, 138–150.
- Chang, C.C., Chung, W.B., Lin, M.W., et al. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Taiwan. I. viral isolation. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 19, 268-276. Cited in: Zimmerman, J.J., 2003a. Historical overview of PRRS virus., in: Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Neumann, E. (Ed.), PRRS Compendium. National Pork Board, Pork Checkoff, pp. 1-7.

- Charpin, C., Mahé, S., Keranflech, A., Belloc, C., Cariolet, R., Le Potier, M.F., Rose, N., 2012. Infectiousness of pigs infected by the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is time-dependent. *Vet. Res.* 43, 1–11.
- Chen, N., Cao, Z., Yu, X., Deng, X., Zhao, T., Wang, L., Liu, Q., Li, X., Tian, K., 2011. Emergence of novel European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mainland China. *J. Gen. Virol.* 92, 880–892.
- Cheon, D.S., Chae, C., 2000. Comparison of virus isolation, reverse transcription-polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from naturally aborted fetuses and stillborn piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 582–7.
- Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., De Palo, E.F., 2007. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin. Chim. Acta.* 383, 30–40.
- Chittick, W.A., Stensland, W.R., Prickett, J.R., Strait, E.L., Harmon, K., Yoon, K.-J., Wang, C., Zimmerman, J.J., 2011. Comparison of RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the detection of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* in porcine oral fluid specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23, 248–53.
- Chittick, W., 2012. Optimizing molecular detection and sequencing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus in clinical oral fluid specimens. *Grad. Theses Diss. Iowa State University.*
- Christianson, W.T., Collins, J.E., Benfield, D.A., Harris, L., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W., Morrison, R.B., Joo, H.S., 1992. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.* 53, 485–8.
- Christianson, W.T., Choi, C.S., Collins, J.E., Molitor, T.W., Morrison, R.B., Joo, H.S., 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can. J. Vet. Res.* 57, 262–268.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Nelson, J.K., Hines, R.J., Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Katz, J.B., Yaeger, M.J., Chase, C.C., 1995a. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1730–4.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Chase, C.L., Yaeger, M.J., Benfield, D.A., 1995b. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 456–64.
- Christopher-Hennings, J., Holler, L.D., Benfield, D.A., Nelson, E.A., 2001. Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 133–42.
- Chung, H.-K., Choi, C., Kim, J., Chae, C., 2002. Detection and differentiation of North American and European genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by multiplex reverse transcription-nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 56–60.
- Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., 1992. Isolation of swine infertility and respiratory

- syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 117–26.
- Corthier, G., Aynaud, J.M., 1977. Comparison of the immune response in serum and bucco-pharyngeal secretions following immunization by different routes with a live hog cholera virus vaccine (Thiverval strain). *Ann. Rech. vétérinaires. Ann. Vet. Res.* 8, 159–65.
- Corzo, C.A., Mondaca, E., Wayne, S., Torremorell, M., Dee, S., Davies, P., Morrison, R.B., 2010. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154, 185–192.
- Costard, S., Porphyre, V., Messad, S., Rakotondrahanta, S., Vidon, H., Roger, F., Pfeiffer, D.U., 2009. Multivariate analysis of management and biosecurity practices in smallholder pig farms in Madagascar. *Prev. Vet. Med.* 92, 199–209.
- Costers, S., Lefebvre, D.J., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Arch. Virol.* 153, 1453–1465.
- Cutler, T.D., Wang, C., Hoff, S.J., Kittawornrat, A., Zimmerman, J.J., 2011. Median infectious dose (ID₅₀) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate MN-184 via aerosol exposure. *Vet. Microbiol.* 151, 229–237.
- Das, A., Spackman, E., Pantin-Jackwood, M.J., Suarez, D.L., 2009. Removal of Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Inhibitors Associated with Cloacal Swab Samples and Tissues for Improved Diagnosis of Avian Influenza Virus by RT-PCR. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 21, 771–778.
- Das, P.B., Dinh, P.X., Ansari, I.H., de Lima, M., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2010. The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *J. Virol.* 84, 1731–40.
- Day, J.E.L., Kyriazakis, I., Lawrence, A.B., 1995. The effect of food deprivation on the expression of foraging and exploratory behaviour in the growing pig. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 42, 193–206.
- Dea, S., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., Rogan, D., 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch. Virol.* 145, 659–88.
- De Buysscher, E.V., Dubois, P.R., 1978. Detection of IgA anti-*Escherichia coli* plasma cells in the intestine and salivary glands of pigs orally and locally infected with *E. coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 107, 593–600.
- De Buysscher, E.V., Berman, D.T., 1980. Secretory immune response in intestinal mucosa and salivary gland after experimental infection of pigs with transmissible gastroenteritis virus. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1214–20.
- Decorte, I., Van der Stede, Y., Nauwynck, H., De Regge, N., Cay, A.B., 2013. Effect of saliva stabilisers on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid by quantitative reverse transcriptase real-time PCR. *Vet. J.* 197, 224–8.
- Decorte, I., Van Breedam, W., Van der Stede, Y., Nauwynck, H.J., De Regge, N., Cay, A.B., 2014. Detection of total and PRRSV-specific antibodies in oral fluids collected with different rope types from PRRSV-vaccinated and experimentally infected pigs. *BMC Vet. Res.* 10, 134.
- Decorte, I., Van Campe, W., Mostin, L., Cay, A.B., De Regge, N., 2015. Diagnosis of the Lelystad

strain of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* infection in individually housed pigs: comparison between serum and oral fluid samples for viral nucleic acid and antibody detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27, 47–54.

- Dee, S.A., Morrison, R., Joo, H., 1993. Eradicating porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus using two-site production and nursery depopulation. *J Swine Heal. Prod.* 1, 20–23.
- Dee, S.A., Joo, H.S., 1994. Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Vet. Rec.* 135, 6–9.
- Dee, S.A., Joo, H.S., Polson, D.D., Marsh, W.E., 1997a. Evaluation of the effects of nursery depopulation of the profitability of 34 pig farms. *Vet. Rec.* 140, 498–500.
- Dee, S.A., Joo, H.S., Polson, D.D., Park, B.K., Pijoan, C., Molitor, T.W., Collins, J.E., King, V., 1997b. Evaluation of the effects of nursery depopulation on the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and the productivity of 34 farms. *Vet. Rec.* 140, 247–8.
- Dee, S.A., Phillips, R., 1998. Using vaccination and unidirectional pig flow to control PRRSV transmission. *J Swine Heal. Prod.* 6 (1), 21-25.
- Dee, S.A., Bierk, M.D., Deen, J., Molitor, T.W., 2001. An evaluation of test and removal for the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 5 swine farms. *Can. J. Vet. Res.* 65, 22–7.
- Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Wiese, C., Otake, S., Joo, H.S., Pijoan, C., 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. *Can. J. Vet. Res. = Rev. Can. Rech. vétérinaire* 66, 232–9.
- Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Weise, C., Eliason, R., Otake, S., Joo, H.S., Pijoan, C., 2003. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. *Can. J. Vet. Res. = Rev. Can. Rech. vétérinaire* 67, 12–9.
- Dee, S.A., 2003a. Principles of prevention, control and eradication., in: Zimmerman, J.J., Yoon, K., Neumann, E. (Ed.), *PRRS Compendium*. National Pork Board, Pork Checkoff, pp. 79–87.
- Dee, S.A., 2003b. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 30 farms by test and removal. *J Swine Heal. Prod.* 12 (3), 129–133.
- Dee, S.A., Deen, J., Otake, S., Pijoan, C., 2004. An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *Can. J. Vet. Res.* 68, 128–133.
- Dee, S.A., Deen, J., Jacobson, L., Rossow, K.D., Mahlum, C., Pijoan, C., 2005. Laboratory model to evaluate the role of aerosols in the transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Rec.* 156, 501–4.
- Delputte, P.L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2002. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 76, 4312–20.
- Delputte, P.L., Meerts, P., Costers, S., Nauwynck, H.J., 2004. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome

- virus in primary macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 179–188.
- Delputte, P.L., Costers, S., Nauwynck, H.J., 2005. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J. Gen. Virol.* 86, 1441–1445.
- Delrue, I., Van Gorp, H., Van Doorselaere, J., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2010. Susceptible cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by stable transfection of sialoadhesin and CD163. *BMC Biotechnol.* 10, 48.
- Dewey, C.E., Wilson, S., Buck, P., Leyenaar, J.K., 1999. The reproductive performance of sows after PRRS vaccination depends on stage of gestation. *Prev. Vet. Med.* 40, 233–241.
- Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E., 2005. Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. *J. Gen. Virol.* 86, 1943–1951.
- Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E., 2006. Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* 351, 249–259.
- Díaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., Mateu, E., 2009. *In silico* prediction and *ex vivo* evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 27, 5603–5611.
- Díaz, I., Venteo, Á., Rebollo, B., Martín-Valls, G.E., Simon-Grifé, M., Sanz, A., Mateu, E., 2012a. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 344–8.
- Díaz, I., Gimeno, M., Darwich, L., Navarro, N., Kuzemtseva, L., López, S., Galindo, I., Segalés, J., Martín, M., Pujols, J., Mateu, E., 2012b. Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Res.* 43, 30.
- Díaz, I., Gimeno, M., Callén, A., Pujols, J., López, S., Charreyre, C., Joisel, F., Mateu, E., 2013. Comparison of different vaccination schedules for sustaining the immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. J.* 197, 438–444.
- Docking, C.M., Van de Weerd, H.A., Day, J.E.L., Edwards, S.A., 2008. The influence of age on the use of potential enrichment objects and synchronisation of behaviour of pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 110, 244–257.
- Dokland, T., 2010. The structural biology of PRRSV. *Virus Res.* 154, 86–97.
- Done, S.H., Paton, D.J., White, M.E., 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): a review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. *Br. Vet. J.* 152, 153–174.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 56, 9–19.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Favoreel, H.W., Pensaert, M.B., 1998. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar

- macrophages. *J. Virol.* 72, 4520–3.
- Duinhof, T.F., van Schaik, G., van Esch, E.J.B., Wellenberg, G.J., 2011. Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. *Vet. Microbiol.* 150, 180-184.
- Escribano, D., Gutiérrez, A.M., Fuentes-Rubio, M., Cerón, J.J., 2014. Saliva chromogranin A in growing pigs: A study of circadian patterns during daytime and stability under different storage conditions. *Vet. J.* 199, 355–359.
- Faaberg, K.S., Hocker, J.D., Erdman, M.M., Harris, D.L.H., Nelson, E.A., Torremorell, M., Plagemann, P.G.W., 2006. Neutralizing antibody responses of pigs infected with natural GP5 N-glycan mutants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* 19, 294–304.
- Fablet, C., Marois-Créhan, C., Grasland, B., Simon, G., Rose, N., 2016a. Factors associated with herd-level PRRSV infection and age-time to seroconversion in farrow-to-finish herds. *Vet. Microbiol.* 192, 10–20.
- Fablet, C., Renson, P., Eono, F., Mahé, S., Eveno, E., Le Dimna, M., Normand, V., Lebret, A., Rose, N., Bourry, O., 2016b. Maternally-derived antibodies (MDAs) impair piglets' humoral and cellular immune responses to vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), *Vet. Microbiol.* 192, 175-180.
- Fahrion, A.S., Beilage, E. grosse, Nathues, H., Dürr, S., Doherr, M.G., 2014. Evaluating perspectives for PRRS virus elimination from pig dense areas with a risk factor based herd index. *Prev. Vet. Med.* 114, 247–258.
- Fekadu, M., Shaddock, J.H., Baer, G.M., 1982. Excretion of rabies virus in the saliva of dogs. *J. Infect. Dis.* 145, 715–9.
- Figuerola, F., Ohlbaum, A., Contreras, G., 1973. Neutralizing antibody response in bovine serum and nasal and salivary secretions after immunization with live or inactivated foot-and-mouth disease virus. *Infect. Immun.* 8, 296–8.
- Firth, A.E., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Wills, N.M., Go, Y.Y., Balasuriya, U.B.R., Atkins, J.F., Snijder, E.J., Posthuma, C.C., 2011. Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *J. Gen. Virol.* 92, 1097–106.
- Flipse, J., Smit, J.M., 2015. The Complexity of a Dengue Vaccine: A Review of the Human Antibody Response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003749.
- Flores-Mendoza, L., Silva-Campa, E., Reséndiz, M., Osorio, F.A., Hernández, J., 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 720–5.
- Forsberg, R., 2005. Divergence Time of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Subtypes. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2131–2134.
- Frydas, I.S., Verbeeck, M., Cao, J., Nauwynck, H., 2013. Replication characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) European subtype 1 (Lelystad) and subtype 3 (Lena) strains in nasal mucosa and cells of the monocytic lineage: indications for the use of new receptors of PRRSV (Lena). *Vet. Res.* 44, 73.
- Frydas, I.S., Trus, I., Kvisgaard, L.K., Bonckaert, C., Reddy, V.R.A.P., Li, Y., Larsen, L.E., Nauwynck, H.J., 2015. Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new

- and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates. *Vet. Res.* 46, 37.
- Frydas, I.S., Nauwynck, H.J., 2016. Replication characteristics of eight virulent and two attenuated genotype 1 and 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in nasal mucosa explants. *Vet. Microbiol.* 182, 156–162.
- Fuentes, M., Tecles, F., Gutiérrez, A., Otal, J., Martínez-Subiela, S., Cerón, J.J., 2011. Validation of an automated method for salivary alpha-amylase measurements in pigs (*Sus scrofa domestica*) and its application as a stress biomarker. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23, 282–7.
- Galina, L., Pijoan, C., Sitjar, M., Christianson, W.T., Rossow, K., Collins, J.E., 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet. Rec.* 134, 60–4.
- Gerber, P.F., O'Neill, K., Owolodun, O., Wang, C., Harmon, K., Zhang, J., Halbur, P.G., Zhou, L., Meng, X.-J., Opriessnig, T., 2013. Comparison of commercial real-time reverse transcription-PCR assays for reliable, early, and rapid detection of heterologous strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected or noninfected boars by use of different. *J. Clin. Microbiol.* 51, 547–56.
- Gifford, A.K., Cloutier, S., Newberry, R.C., 2007. Objects as enrichment: Effects of object exposure time and delay interval on object recognition memory of the domestic pig. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 107, 206–217.
- Gimeno, M., Darwich, L., Diaz, I., de la Torre, E., Pujols, J., Martín, M., Inumaru, S., Cano, E., Domingo, M., Montoya, M., Mateu, E., 2011. Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. Res.* 42, 9.
- Gomes-Keller, M.A., Gonczi, E., Tandon, R., Riondato, F., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Lutz, H., 2006. Detection of Feline Leukemia Virus RNA in Saliva from Naturally Infected Cats and Correlation of PCR Results with Those of Current Diagnostic Methods. *J. Clin. Microbiol.* 44, 916–922.
- Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, C.A., Dea, S., 1999. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 20–6.
- Gordon, S.C., 1992. Effects of blue-eared pig disease on a breeding and fattening unit. *Vet. Rec.* 130, 513–514.
- Greabu, M., Battino, M., Mohora, M., Totan, A., Didilescu, A., Spinu, T., Totan, C., Miricescu, D., Radulescu, R., 2009. Saliva—a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J. Med. Life* 2, 124–32.
- Gu, W., Guo, L., Yu, H., Niu, J., Huang, M., Luo, X., Li, R., Tian, Z., Feng, L., Wang, Y., 2015. Involvement of CD16 in antibody-dependent enhancement of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Gen. Virol.* 96, 1712–22.
- Gutiérrez, A.M., Martínez-Subiela, S., Eckersall, P.D., Cerón, J.J., 2009. C-reactive protein quantification in porcine saliva: A minimally invasive test for pig health monitoring. *Vet. J.* 181, 261–265.
- Halbur, P.G., Paul, P.S., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J., Rathje, J.A., 1996. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)

- isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 11–20.
- Hale, A.D., Green, J., Brown, D.W., 1996. Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. *J. Virol. Methods* 57, 195–201.
- Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., Gojobori, T., 2005. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1024–31.
- Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S., 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 38, 528–39.
- Hermann, J.R., Muñoz-Zanzi, C.A., Roof, M.B., Burkhardt, K., Zimmerman, J.J., 2005. Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. *Vet. Microbiol.* 110, 7–16.
- Hermann, J., Hoff, S., Muñoz-Zanzi, C., Yoon, K.-J., Roof, M., Burkhardt, A., Zimmerman, J., 2007. Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols. *Vet. Res.* 38, 81–93.
- Hermann, J.R., Muñoz-Zanzi, C.A., Zimmerman, J.J., 2009. A method to provide improved dose–response estimates for airborne pathogens in animals: An example using porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Vet. Microbiol.* 133, 297–302.
- Hill, H., 1990. Overview and history of Mystery Swine Disease (swine infertility and respiratory syndrome). In: *Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting*. Livestock Conversation Institute, Madison, WI, USA, 29–31.
- Hill, H., Owen, W., Eernisse, K., Zimmerman, J.J., Uhlenhopp, E., Frey, M., 1992. Prevalence of SIRS virus in Iowa swine herds. *Am Assoc Swine Pr. Newsl.* 4, 47.
- Hirose, O., Shibata, I., Kudou, H., Samegai, Y., Yoshizawa, S., Ono, M., Nishimura, M., Hiroike, T., Kageyama, K., Sakano, T., 1995. Experimental infection of SPF piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses isolated from two farms. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 991–5.
- Hoffmann, P., Prickett, J., Zimmerman J., Karriker, L., Main, R., 2008. Implementation and validation of swine oral fluid collection into a commercial system, in: *Proceedings of the 39th American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting Proceedings*. pp. 301–302.
- Hofmann, M.A., 2003. Construction of an infectious chimeric classical swine fever virus containing the 5'UTR of bovine viral diarrhea virus, and its application as a universal internal positive control in real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 114, 77–90.
- Holm-Hansen, C., Nyombi, B., Nyindo, M., 2007. Saliva-Based HIV Testing among Secondary School Students in Tanzania using the OraQuick(R) Rapid HIV1/2 Antibody Assay. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1098, 461–466.
- Holtkamp, D.J., Polson, D.D., Torremorell, M., Morrison, B., Classen, D.M., Becton, L., Henry, S., Rodibaugh, M.T., Rowland, R.R., Snelson, H., Straw, B., Yeske, P., Zimmerman, J., 2011. [Terminology for classifying the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) status of swine herds]. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere. Nutztiere.* 39, 101–12.

- Holtkamp, D.J., 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J. Swine Heal. Prod.* 21, 72–84.
- Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., Fach, P., 2003. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5835.
- Hopper, S.A., White, M.E., Twiddy, N., 1992. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet. Rec.* 131, 140–4.
- Horner, M.W., 1976. The passage of drugs into horse saliva and the suitability of saliva for pre-race testing. *Br. J. Sports Med.* 10, 133–40.
- Horter, D.C., Pogranichniy, R.M., Chang, C.-C., Evans, R.B., Yoon, K.-J., Zimmerman, J.J., 2002. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Microbiol.* 86, 213–28.
- Huang, C., Zhang, Q., Guo, X., Yu, Z., Xu, A., Tang, J., Feng, W., 2014. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4 antagonizes beta interferon expression by targeting the NF- κ B essential modulator. *J. Virol.* 88, 10934–45.
- Huang, Y., Guo, R., Zhang, Y., Zhang, X., Xia, X., Sun, H., 2013. [Establishment of a porcine CD151 transgenic PK-15 cell line susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 53, 507–14.
- Huang, Y.W., Dryman, B.A., Li, W., Meng, X.J., 2009. Porcine DC-SIGN: Molecular cloning, gene structure, tissue distribution and binding characteristics. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 464–480.
- Jacobs, A.C., Hermann, J.R., Munoz-Zanzi, C., Prickett, J.R., Roof, M.B., Yoon, K.-J., Zimmerman, J.J., 2010. Stability of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* at ambient temperatures. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 257–260.
- Johnson, C.R., Griggs, T.F., Gnanandarajah, J., Murtaugh, M.P., 2011. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 92, 1107–1116.
- Jusa, E.R., Inaba, Y., Kouno, M., Hirose, O., 1997. Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* 58, 488–91.
- Karniychuk, U.U., Saha, D., Geldhof, M., Vanhee, M., Cornillie, P., Van den Broeck, W., Nauwynck, H.J., 2011. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. *Microb. Pathog.* 51, 194–202.
- Karniychuk, U.U., Nauwynck, H.J., 2013. Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Res.* 44, 95.
- Kasempimolporn, S., Saengseesom, W., Lumlertdacha, B., Sitprija, V., 2000. Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3098–9.
- Keffaber, K.K., 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pr. News* 1, 1–9.
- Kemp, B.M., Monroe, C., Smith, D.G., 2006. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *J. Archaeol. Sci.* 33, 1680–1689.
- Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., Frey, M.L., 1993. Enhanced replication of porcine

- reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477–83.
- Kim, J.-K., Fahad, A.-M., Shanmukhappa, K., Kapil, S., 2006. Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. *J. Virol.* 80, 689–96.
- Kim, T.S., Benfield, D.A., Rowland, R.R.R., 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis. *Virus Res.* 85, 133–140.
- Kim, W.-I., Lee, D.-S., Johnson, W., Roof, M., Cha, S.-H., Yoon, K.-J., 2007. Effect of genotypic and biotypic differences among PRRS viruses on the serologic assessment of pigs for virus infection. *Vet. Microbiol.* 123, 1–14.
- Kittawornrat, A., Prickett, J., Chittick, W., Wang, C., Engle, M., Johnson, J., Patnayak, D., Schwartz, T., Whitney, D., Olsen, C., Schwartz, K., Zimmerman, J., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res.* 154, 170–6.
- Kittawornrat, A., Prickett, J., Wang, C., Olsen, C., Irwin, C., Panyasing, Y., Ballagi, A., Rice, A., Main, R., Johnson, J., Rademacher, C., Hoogland, M., Rowland, R., Zimmerman, J., 2012a. Detection of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 262–9.
- Kittawornrat, A., Wang, C., Anderson, G., Ballagi, A., Broes, A., Carman, S., Doolittle, K., Galeota, J., Johnson, J., Lizano, S., Nelson, E., Patnayak, D., Pogradichniy, R., Rice, A., Scherba, G., Zimmerman, J., 2012b. Ring test evaluation of the repeatability and reproducibility of a *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* oral fluid antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 1057–63.
- Klinge, K.L., Vaughn, E.M., Roof, M.B., Bautista, E.M., Murtaugh, M.P., 2009. Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virol. J.* 6, 177.
- Kranker, S., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., Bøtner, A., 1998. Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 61, 21–31.
- Kreuzer, K.-A., Bohn, A., Lass, U., Peters, U., Schmidt, C., 2000. Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan™ probe format in the LightCycler™ instrument. *Mol. Cell. Probes* 14, 57–60.
- Kristensen, C.S., Bøtner, A., Takai, H., Nielsen, J.P., Jorsal, S.E., 2004. Experimental airborne transmission of PRRS virus. *Vet. Microbiol.* 99, 197–202.
- Kuster, K., Cousin, M.-E., Jemmi, T., Schüpbach-Regula, G., Magouras, I., 2015. Expert Opinion on the Perceived Effectiveness and Importance of On-Farm Biosecurity Measures for Cattle and Swine Farms in Switzerland. *PLoS One* 10, e0144533.
- Kvisgaard, L.K., Hjulsgaard, C.K., Brar, M.S., Leung, F.C.C., Larsen, L.E., 2013. Genetic dissection of complete genomes of Type 2 PRRS viruses isolated in Denmark over a period of 15 years. *Vet. Microbiol.* 167, 334–344.
- Labarque, G.G., Nauwynck, H.J., Van Reeth, K., Pensaert, M.B., 2000. Effect of cellular changes and

- onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. *J. Gen. Virol.* 81, 1327–34.
- Labarque, G., Van Gucht, S., Nauwynck, H., Van Reeth, K., Pensaert, M., 2003. Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Vet. Res.* 34, 249–60.
- Labarque, G., Reeth, K. Van, Nauwynck, H., Drexler, C., Gucht, S. Van, Pensaert, M., 2004. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* 22, 4183–4190.
- Lager, K.M., Mengeling, W.L., 1995. Pathogenesis of in utero infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res. = Rev. Can. Rech. vétérinaire* 59, 187–192.
- Lager, K.M., Mengeling, W.L., Brockmeier, S.L., 1996. Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts. *Vet. Rec.* 138, 227–8.
- Lager, K.M., Mengeling, W.L., Brockmeier, S.L., 1997a. Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet. Microbiol.* 58, 113–125.
- Lager, K.M., Mengeling, W.L., Brockmeier, S.L., 1997b. Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet. Microbiol.* 58, 127–133.
- Lamontagne, L., Page, C., Laroche, R., Longtin, D., Magar, R., 2001. Polyclonal activation of B cells occurs in lymphoid organs from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82, 165–82.
- Lamontagne, L., Pagé, C., Laroche, R., Magar, R., 2003. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8^{high} T cells. *Viral Immunol.* 16, 395–406.
- Lawson, S.R., Rossow, K.D., Collins, J.E., Benfield, D.A., Rowland, R.R., 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection. *Virus Res.* 51, 105–113.
- Lee, C., Yoo, D., 2006. The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology* 355, 30–43.
- Lee, S.-M., Schommer, S.K., Kleiboeker, S.B., 2004. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in in vitro interferon phenotypes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 217–231.
- Lee, Y.J., Park, C.-K., Nam, E., Kim, S.-H., Lee, O.-S., Lee, D.S., Lee, C., 2010. Generation of a porcine alveolar macrophage cell line for the growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol. Methods* 163, 410–415.
- Lewis, M.G., Wright, K.A., Lafrado, L.J., Shanker, P.J., Palumbo, N.E., Lemoine, E.D., Olsen, R.G., 1987. Saliva as a source of feline leukemia virus antigen for diagnosis of disease. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1320–2.
- Li, G., Ren, X., 2011. Differentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus N protein using a virus-based ELISA. *Hybridoma (Larchmt).* 30, 195–8.

- Liu, Y., Shi, W., Zhou, E., Wang, S., Hu, S., Cai, X., Rong, F., Wu, J., Xu, M., Xu, M., Li, L., 2010. Dynamic changes in inflammatory cytokines in pigs infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 1439–45.
- Loemba, H.D., Mounir, S., Mardassi, H., Archambault, D., Dea, S., 1996. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 141, 751–61.
- Loftager, M.K., Eriksen, L., Nielsen, R., 1993. Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in mucosal secretions and sera of infected pigs as demonstrated by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* 54, 57–62.
- Lohse, L., Nielsen, J., Eriksen, L., 2004. Temporary CD8+ T-cell depletion in pigs does not exacerbate infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Viral Immunol.* 17, 594–603.
- Lopez, O.J., Oliveira, M.F., Alvarez Garcia, E., Kwon, B.J., Doster, A., Osorio, F.A., 2007. Protection against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 269–275.
- López Fuertes, L., Doménech, N., Alvarez, B., Ezquerro, A., Domínguez, J., Castro, J., Alonso, F., 1999. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res.* 64, 33–42.
- Loula, T., 1991. Mystery pig disease. *Agri-Practice* 12, 23–34.
- Loving, C.L., Brockmeier, S.L., Sacco, R.E., 2007. Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* 120, 217–229.
- Lowe, J.F., Zuckermann, F.A., Firkins, L.D., Schnitzlein, W.M., Goldberg, T.L., 2006. Immunologic responses and reproductive outcomes following exposure to wild-type or attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine under field conditions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 1082–1088.
- Lurchachaiwong, W., Payungporn, S., Srisatidnarakul, U., Mungkundar, C., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., 2007. Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 55–60.
- Maher, N., Dillon, H.K., Vermund, S.H., Unnasch, T.R., 2001. Magnetic bead capture eliminates PCR inhibitors in samples collected from the airborne environment, permitting detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 449–52.
- Martín-Valls, G.E., Kvisgaard, L.K., Tello, M., Darwich, L., Cortey, M., Burgara-Estrella, A.J., Hernández, J., Larsen, L.E., Mateu, E., 2014. Analysis of ORF5 and full-length genome sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates of genotypes 1 and 2 retrieved worldwide provides evidence that recombination is a common phenomenon and may produce mosaic isolates. *J. Virol.* 88, 3170–81.
- Martín-Valls, GE, Hidalgo M, Cano E, Mateu E. Alternative sampling methods in new born piglets for PRRSV diagnostics. Unpublished.
- Martínez-Lobo, F.J., Díez-Fuertes, F., Segalés, J., García-Artiga, C., Simarro, I., Castro, J.M., Prieto, C., 2011a. Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model. *Vet. Microbiol.* 154, 58–68.

- Martínez-Lobo, F.J., Díez-Fuertes, F., Simarro, I., Castro, J.M., Prieto, C., 2011b. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus isolates differ in their susceptibility to neutralization. *Vaccine* 29, 6928–6940.
- Mateu, E., Martín, M., Vidal, D., 2003. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain. *J. Gen. Virol.* 84, 529–34.
- Mateu, E., Tello, M., Coll, A., Casal, J., Martín, M., 2006. Comparison of three ELISAs for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Rec.* 159, 717–717.
- Matteucci, D., Baldinotti, F., Mazzetti, P., Pistello, M., Bandecchi, P., Ghilarducci, R., Poli, A., Tozzini, F., Bendinelli, M., 1993. Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 494–501.
- McCaw MB, 1995. McREBEL™ PRRS: Management Procedures for PRRS control in large herd nurseries, in: *Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference*. Ames, Iowa, p. 22:161-162.
- McCaw, M.B., 2000a. Impact of McREBEL (minimal cross-fostering) management upon nursery pig sale weight and survival under production conditions in PRRS asymptomatic herds, in: *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*. Melbourne, Australia, p. 333.
- McCaw, M.B., 2000b. Effect of reducing crossfostering at birth on piglet mortality and performance during an acute outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Swine Heal. Prod.* 8, 15–21.
- Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., 2003. Gradual development of the interferon- γ response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309, 18–31.
- Meng, X., 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet. Microbiol.* 74, 309–329.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., 1994. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1391–8.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., 1998. Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval. *Am. J. Vet. Res.* 59, 52–5.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., 2000. A brief review of procedures and potential problems associated with the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Res.* 31, 61–69.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Koehler, K.J., 2003a. Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 93, 13–24.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Clouser, D.F., 2003b. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Microbiol.* 93, 25–38.

- Meulenberg, J.J.M., Hulst, M.M., de Meijer, E.J., Moonen, P.L.J.M., den Besten, A., de Kluyver, E.P., Wensvoort, G., Moormann, R.J.M., 1993. Lelystad Virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192, 62–72.
- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., Mégraud, F., 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 35, 995–8.
- Murtaugh, M.P., Genzow, M., 2011. Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vaccine* 29, 8192–8204.
- Nedialkova, D.D., Ulferts, R., van den Born, E., Lauber, C., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2009. Biochemical characterization of arterivirus nonstructural protein 11 reveals the nidovirus-wide conservation of a replicative endoribonuclease. *J. Virol.* 83, 5671–82.
- Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J.E., Benfield, D.A., 1993. Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3184–9.
- Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A., 1994. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 410–415.
- Nielsen, T.L., Nielsen, J., Have, P., Baekbo, P., Hoff-Jørgensen, R., Bøtner, A., 1997. 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.* 54, 101–12.
- Nieuwenhuis, N., Duinhof, T.F., van Nes, A., 2012. Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Vet. Rec.* 170, 225.
- Nilubol, D., Platt, K., Halbur, P., Torremorell, M., Harris, D., 2004. The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Vet. Microbiol.* 102, 11–18.
- Nilubol, D., Thacker, B.J., Thacker, E.L., 2007. Antibody response of pigs vaccinated with modified live and killed PRRSV vaccines followed by challenge with high and low virulent strains of PRRSV, in: *Proceedings of the 5th International Symposium on Emerging and Re-Emerging Pig Diseases*. Krakow, Poland, p. 146.
- Nodelijk, G., de Jong, M.C., Van Nes, A., Vernooij, J.C., Van Leengoed, L.A., Pol, J.M., Verheijden, J.H., 2000. Introduction, persistence and fade-out of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a Dutch breeding herd: a mathematical analysis. *Epidemiol. Infect.* 124, 173–182.
- Nodelijk, G., 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis. A review. *Vet. Q.* 24, 95–100.
- Nodelijk, G., Nielen, M., De Jong, M.C.M., Verheijden, J.H.M., 2003. A review of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Dutch breeding herds: population dynamics and clinical relevance. *Prev. Vet. Med.* 60, 37–52.
- Nokes, D.J., Enqueslassie, F., Nigatu, W., Vyse, A.J., Cohen, B.J., Brown, D.W., Cutts, F.T., 2001. Has oral fluid the potential to replace serum for the evaluation of population immunity levels? A study of measles, rubella and hepatitis B in rural Ethiopia. *Bull. World Health Organ.* 79, 588–

95.

- Nolan, T., Hands, R.E., Ogunkolade, W., Bustin, S.A., 2006. SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations, *Analytical Biochemistry*.
- Nöremark, M., Frössling, J., Lewerin, S.S., 2010. Application of Routines that Contribute to On-farm Biosecurity as Reported by Swedish Livestock Farmers. *Transbound. Emerg. Dis.* 57, 225-236.
- Ochert, A.S., Boulter, A.W., Birnbaum, W., Johnson, N.W., Teo, C.G., 1994. Inhibitory effect of salivary fluids on PCR: potency and removal. *PCR Methods Appl.* 3, 365–8.
- Ohlinger, V.F., Pesch, S., Bischoff, C., 2000. History, occurrence, dynamics and current status of PRRS in Europe. *Vet. Res.* 31, 86–87.
- OIE1992 [WWW Document], 1992. URL <http://www.oie.int/doc/ged/D7827.PDF> (accessed 9.21.15).
- Oleksiewicz, M., Bøtner, A., Madsen, K., Storgaard, T., 1998. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet. Microbiol.* 64, 7–22.
- Oleksiewicz, M.B., Stadejek, T., Maćkiewicz, Z., Porowski, M., Pejsak, Z., 2005. Discriminating between serological responses to European-genotype live vaccine and European-genotype field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by peptide ELISA. *J. Virol. Methods* 129, 134–144.
- Olsen, C., Karriker, L., Wang, C., Binjawadagi, B., Renukaradhya, G., Kittawornrat, A., Lizano, S., Coetzee, J., Main, R., Meiszberg, A., Panyasing, Y., Zimmerman, J., 2013a. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet. J.* 198, 158–63.
- Olsen, C., Wang, C., Christopher-Hennings, J., Doolittle, K., Harmon, K.M., Abate, S., Kittawornrat, A., Lizano, S., Main, R., Nelson, E.A., Otterson, T., Panyasing, Y., Rademacher, C., Rauh, R., Shah, R., Zimmerman, J., 2013b. Probability of detecting Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection using pen-based swine oral fluid specimens as a function of within-pen prevalence. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 328–35.
- Osorio, F.A., Galeota, J.A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., Zuckermann, F., Laegreid, W.W., 2002. Passive Transfer of Virus-Specific Antibodies Confers Protection against Reproductive Failure Induced by a Virulent Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Establishes Sterilizing Immunity. *Virology* 302, 9–20.
- Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J., 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241–50.
- Otake, S., Dee, S.A., Jacobson, L., Torremorell, M., Pijoan, C., 2002. Evaluation of aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under controlled field conditions. *Vet. Rec.* 150, 804–8.
- Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Trincado, C., Pijoan, C., 2003. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). *Vet. Rec.* 152, 73–6.
- Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Pijoan, C., 2004. Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by

- individual houseflies (*Musca domestica*). Vet. Rec. 154, 80–5.
- Palzer, A., Haedke, K., Heinritzi, K., Zoels, S., Ladinig, A., Ritzmann, M., 2015. Associations among *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in pigs with polyserositis. Can. Vet. journal. La Rev. vétérinaire Can. 56, 285–7.
- Parida, S., Anderson, J., Cox, S.J., Barnett, P. V, Paton, D.J., 2006. Secretory IgA as an indicator of oro-pharyngeal foot-and-mouth disease virus replication and as a tool for post vaccination surveillance. Vaccine 24, 1107–16.
- Park, B.K., Yoon, I.J., Joo, H.S., 1996. Pathogenesis of plaque variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant sows. Am. J. Vet. Res. 57, 320–3.
- Paton, D.J., Brown, I.H., Scott, A.C., Done, S.H., Edwards, S., 1992. Isolation of a Lelystad virus-like agent from British pigs and scanning electron microscopy of infected macrophages. Vet. Microbiol. 33, 195–201.
- Patton, J.B., Rowland, R.R., Yoo, D., Chang, K.-O., 2009. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. Virus Res. 140, 161–171.
- Pileri, E., Gibert, E., Soldevila, F., García-Saenz, A., Pujols, J., Diaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martín, M., Mateu, E., 2015. Vaccination with a genotype 1 modified live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus significantly reduces viremia, viral shedding and transmission of the virus in a quasi-natural experimental model. Vet. Microbiol. 175, 7–16.
- Pileri, E., Mateu, E., 2016. Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. Vet. Res. 47, 108.
- Plagemann, P.G.W., 2003. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Origin Hypothesis. Emerg. Infect. Dis. 9, 903–908.
- Plana-Durán, J., Bastons, M., Urniza, A., Vayreda, M., Vilà, X., Mañé, H., 1997. Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Microbiol. 55, 361–70.
- Plana, J., Vayreda, M., Vilarrasa, J., Bastons, M., Rosell, R., Martinez, M., San Gabriel, A., Pujols, J., Badiola, J.L., Ramos, J.A., 1992. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. Vet. Microbiol. 33, 203–11.
- Pol, J.M., Wagenaar, F., Reus, J.E., 1997. Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. Vet. Microbiol. 55, 203–8.
- Poli, A., Giannelli, C., Pistello, M., Zaccaro, L., Pieracci, D., Bendinelli, M., Malvaldi, G., 1992. Detection of salivary antibodies in cats infected with feline immunodeficiency virus. J. Clin. Microbiol. 30, 2038–41.
- Prickett, J., Simer, R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.-J., Evans, R.B., Zimmerman, J.J., 2008a. Detection of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. J. Vet. Diagn. Invest. 20, 156–63.
- Prickett, J.R., Kim, W., Simer, R., Yoon, K.-J., Zimmerman, J., 2008b. Oral-fluid samples for

- surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Heal. Prod* 16, 86–91.
- Prickett, J., 2009. Detection of viral pathogens of swine using oral fluid specimens. Grad. Theses Diss. Iowa State University.
- Prickett, J.R., Zimmerman, J.J., 2010. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim. Health Res. Rev.* 11, 207–16.
- Prieto, C., Suárez, P., Bautista, J.M., Sánchez, R., Rillo, S.M., Simarro, I., Solana, A., Castro, J.M., 1996a. Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology* 45, 383–95.
- Prieto, C., Sanchez, R., Martin-Rillo, S., Suarez, P., Simarro, I., Solana, A., Castro, J.M., 1996b. Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Rec.* 138, 536–539.
- Prieto, C., Suarez, P., Simarro, I., Garcia, C., Fernandez, A., Castro, J.M., Suárez, P., García, C., Fernández, A., 1997. Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. *Vet Microbiol* 57, 301–311.
- Prieto, C., García, C., Simarro, I., Castro, J.M., 2003. Temporal localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in reproductive tissues of experimentally infected boars. *Theriogenology* 60, 1505–1514.
- Prieto, C., Álvarez, E., Martínez-Lobo, F.J., Simarro, I., Castro, J.M., 2008. Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred. *Vet. J.* 175, 356–363.
- Prieto, C., Martínez-Lobo, F.J., Díez-Fuertes, F., Aguilar-Calvo, P., Simarro, I., Castro, J.M., 2011. Immunisation of pigs with a major envelope protein sub-unit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) results in enhanced clinical disease following experimental challenge. *Vet. J.* 189, 323–329.
- Qiao, S., Jiang, Z., Tian, X., Wang, R., Xing, G., Wan, B., Bao, D., Liu, Y., Hao, H., Guo, J., Zhang, G., 2011. Porcine FcyRIIb mediates enhancement of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *PLoS One* 6, e28721.
- Ramirez, A., Wang, C., Prickett, J.R., Pogranichniy, R., Yoon, K.-J., Main, R., Johnson, J.K., Rademacher, C., Hoogland, M., Hoffmann, P., Kurtz, A., Kurtz, E., Zimmerman, J., 2012. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev. Vet. Med.* 104, 292–300.
- Ramsay, M., Brugha, R., Brown, D., 1997. Surveillance of measles in England and Wales: implications of a national saliva testing programme. *Bull. World Health Organ.* 75, 515–21.
- Rascón-Castelo, E., Burgara-Estrella, A., Mateu, E., Hernández, J., 2015. Immunological Features of the Non-Structural Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viruses* 7, 873–886.
- Ribbens, S., Dewulf, J., Koenen, F., Mintiens, K., De Sadeleer, L., de Kruif, A., Maes, D., 2008. A survey on biosecurity and management practices in Belgian pig herds. *Prev. Vet. Med.* 83, 228–241.
- Robinson, S.R., Abrahante, J.E., Johnson, C.R., Murtaugh, M.P., 2013. Purifying selection in porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF5a protein influences variation in envelope

- glycoprotein 5 glycosylation. *Infect. Genet. Evol.* 20, 362–368.
- Robinson, S.R., Li, J., Nelson, E.A., Murtaugh, M.P., 2015. Broadly neutralizing antibodies against the rapidly evolving porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 203, 56–65.
- Romagosa, A., Gramer, M., Joo, H.S., Torremorell, M., 2012. Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza Other Respi. Viruses* 6, 110–118.
- Ropp, S.L., Wees, C.E.M., Fang, Y., Nelson, E.A., Rossow, K.D., Bien, M., Arndt, B., Preszler, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Collins, J.E., Benfield, D.A., Faaberg, K.S., 2004. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J. Virol.* 78, 3684–703.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., Rasmussen, O.F., 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 37–45.
- Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A., Collins, J.E., 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 3–12.
- Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A., 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 32, 361–73.
- Rowland, R.R., Lawson, S., Rossow, K., Benfield, D.A., 2003. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet. Microbiol.* 96, 219–235.
- Sahlström, L., Virtanen, T., Kyyrö, J., Lyytikäinen, T., 2014. Biosecurity on Finnish cattle, pig and sheep farms – results from a questionnaire. *Prev. Vet. Med.* 117, 59–67.
- Sattler, T., Wodak, E., Revilla-Fernández, S., Schmoll, F., 2014. Comparison of different commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine respiratory and reproductive syndrome virus in serum. *BMC Vet. Res.* 10, 300.
- Schipper, R.G., Silletti, E., Vingerhoeds, M.H., 2007. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch. Oral Biol.* 52, 1114–35.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014–1026.
- Schurrer, J.A., Dee, S.A., Moon, R.D., Murtaugh, M.P., Finnegan, C.P., Deen, J., Kleiboeker, S.B., Pijoan, C.B.J., 2005. Retention of ingested porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1517–25.
- Scotti, M., Prieto, C., Alvarez, E., Simarro, I., Castro, J.M., 2007. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet. Rec.* 161, 809–13.
- Seddon, Y.M., Guy, J.H., Edwards, S.A., 2012. Optimising oral fluid collection from groups of pigs: effect of housing system and provision of ropes. *Vet. J.* 193, 180–4.
- Seybert, A., van Dinten, L.C., Snijder, E.J., Ziebuhr, J., 2000. Biochemical characterization of the equine arteritis virus helicase suggests a close functional relationship between arterivirus

- and coronavirus helicases. *J. Virol.* 74, 9586–93.
- Seybert, A., Posthuma, C.C., van Dinten, L.C., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J., 2005. A complex zinc finger controls the enzymatic activities of nidovirus helicases. *J. Virol.* 79, 696–704.
- Shanmukhappa, K., Kim, J.-K., Kapil, S., 2007. Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virol. J.* 4, 62.
- Shi, M., Lam, T.T.-Y., Hon, C.-C., Hui, R.K.-H., Faaberg, K.S., Wennblom, T., Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Leung, F.C.-C., 2010. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res.* 154, 7–17.
- Shi, M., Lemey, P., Singh Brar, M., Suchard, M.A., Murtaugh, M.P., Carman, S., D’Allaire, S., Delisle, B., Lambert, M.-È., Gagnon, C.A., Ge, L., Qu, Y., Yoo, D., Holmes, E.C., Chi-Ching Leung, F., 2013. The spread of Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in North America: A phylogeographic approach. *Virology* 447, 146–154.
- Shieh, Y.S., Wait, D., Tai, L., Sobsey, M.D., 1995. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 54, 51–66.
- Silva-Campa, E., Cordoba, L., Fraile, L., Flores-Mendoza, L., Montoya, M., Hernández, J., 2010. European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virology* 396, 264–271.
- Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G.E., Vilar, M.J., García-Bocanegra, I., Martín, M., Mateu, E., Casal, J., 2013. Biosecurity practices in Spanish pig herds: Perceptions of farmers and veterinarians of the most important biosecurity measures. *Prev. Vet. Med.* 110, 223–231.
- Smith, D.R., Gray, J.T., Moxley, R.A., Younts-Dahl, S.M., Blackford, M.P., Hinkley, S., Hungerford, L.L., Milton, C.T., Klopfenstein, T.J., 2004. A diagnostic strategy to determine the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 status of pens of feedlot cattle. *Epidemiol. Infect.* 132, 297–302.
- Smith, D.R., Moxley, R.A., Clowser, S.L., Folmer, J.D., Hinkley, S., Erickson, G.E., Klopfenstein, T.J., 2005. Use of Rope Devices to Describe and Explain the Feedlot Ecology of *Salmonella* by Time and Place. *Foodborne Pathog. Dis.* 2, 61–69.
- Snijder, E.J., Kikkert, M., Fang, Y., 2013. Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 94, 2141–2163.
- Spagnuolo-Weaver, M., Walker, I., McNeilly, F., Calvert, V., Graham, D., Burns, K., Adair, B., Allan, G., 1998. The reverse transcription polymerase chain reaction for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome: Comparison with virus isolation and serology. *Vet. Microbiol.* 62, 207–215.
- Spear, A., Faaberg, K.S., 2015. Development of a genome copy specific RT-qPCR assay for divergent strains of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol. Methods* 218, 1–6.
- Spilman, M.S., Welbon, C., Nelson, E., Dokland, T., 2009. Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. *J. Gen. Virol.* 90, 527–35.
- Stadejek, T., Stankevicius, A., Storgaard, T., Oleksiewicz, M.B., Belák, S., Drew, T.W., Pejsak, Z.,

2002. 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.* 83, 1861–1873.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, M.B., Potapchuk, D., Podgórska, K., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.* 87, 1835–41.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, M.B., Scherbakov, A.V., Timina, A.M., Krabbe, J.S., Chabros, K., Potapchuk, D., 2008. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch. Virol.* 153, 1479–1488.
- Stanford, K., Bach, S.J., Marx, T.H., Jones, S., Hansen, J.R., Wallins, G.L., Zahiroddini, H., McAllister, T.A., 2005. Monitoring *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated and naturally colonized feedlot cattle and their environment. *J. Food Prot.* 68, 26–33.
- Stankevicius, A., Buitkuvienė, J., Sutkiene, V., Spancerniene, U., Pampariene, I., Pautienius, A., Oberauskas, V., Zilinskas, H., Zymantiene, J., 2016. Detection and molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Lithuanian wild boar populations. *Acta Vet. Scand.* 58, 51.
- Stevenson, G.W., Van Alstine, W.G., Kanitz, C.L., Keffaber, K.K., 1993. Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 432–4.
- Sullivan, N.J., 2001. Antibody-mediated enhancement of viral disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 260, 145–69.
- Sun, L., Li, Y., Liu, R., Wang, X., Gao, F., Lin, T., Huang, T., Yao, H., Tong, G., Fan, H., Wei, Z., Yuan, S., 2013. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF5a protein is essential for virus viability. *Virus Res.* 171, 178–185.
- Sun, Y., Li, D., Giri, S., Prasanth, S.G., Yoo, D., 2014. Differential host cell gene expression and regulation of cell cycle progression by nonstructural protein 11 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Biomed Res. Int.* 2014, 430508.
- Sun, Z., Chen, Z., Lawson, S.R., Fang, Y., 2010. The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions. *J. Virol.* 84, 7832–46.
- Sur, J.H., Cooper, V.L., Galeota, J.A., Hesse, R.A., Doster, A.R., Osorio, F.A., 1996. In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2280–6.
- Sur, J.H., Doster, A.R., Christian, J.S., Galeota, J.A., Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Osorio, F.A., 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J. Virol.* 71, 9170–9.
- Sur, J.H., Doster, A.R., Osorio, F.A., 1998. Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 35, 506–14.
- Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Evans, L.E., Landgraf, J.G., Wills, R.W., Sanderson, T.P., McGinley, M.J., Brevik, A.K., Ciszewski, D.K., 1994. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 1943–8.

- Terpstra, C., Wensvoort, G., Pol, J.M., 1991. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet. Q.* 13, 131–6.
- Thaa, B., Sinhadri, B.C., Tievesch, C., Krause, E., Veit, M., 2013. Signal peptide cleavage from GP5 of PRRSV: a minor fraction of molecules retains the decoy epitope, a presumed molecular cause for viral persistence. *PLoS One* 8, e65548.
- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R., Thacker, B.J., 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 37, 620–7.
- Thakur, K.K., Revie, C.W., Hurnik, D., Poljak, Z., Sanchez, J., 2015. Simulation of between-farm transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Ontario, Canada using the North American Animal Disease Spread Model. *Prev. Vet. Med.* 118, 413–426.
- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A., Damrongwatanapokin, S., 2004. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet. Microbiol.* 101, 9–21.
- Toplak, I., Rihtarič, D., Hostnik, P., Grom, J., Štukelj, M., Valenčak, Z., 2012. Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests. *J. Virol. Methods* 179, 51–56.
- Torremorell, M., Pijoan, C., Janni, K., Walker, R., Joo, H.S., 1997. Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. *Am. J. Vet. Res.* 58, 828–32.
- Torremorell, M., Henry, S., Christianson, W., 2003. Eradication using herd closure, in: Zimmerman, J. J., Yoon, K., Neumann, E. (Ed.), *PRRS Compendium*. National Pork Board, Pork Checkoff, pp. 111–115.
- Trible, B.R., Popescu, L.N., Monday, N., Calvert, J.G., Rowland, R.R.R., 2015. A single amino acid deletion in the matrix protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus confers resistance to a polyclonal swine antibody with broadly neutralizing activity. *J. Virol.* 89, 6515–20.
- Trickett, S.L., Guy, J.H., Edwards, S.A., 2009. The role of novelty in environmental enrichment for the weaned pig. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 116, 45–51.
- Van Breedam, W., Van Gorp, H., Zhang, J.Q., Crocker, P.R., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2010. The M/GP5 Glycoprotein Complex of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Binds the Sialoadhesin Receptor in a Sialic Acid-Dependent Manner. *PLoS Pathog.* 6, e1000730.
- Van de Weerd, H.A., Docking, C.M., Day, J.E.L., Avery, P.J., Edwards, S.A., 2003. A systematic approach towards developing environmental enrichment for pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 84, 101–118.
- van der Linden, I.F., Voermans, J.J., van der Linde-Bril, E., Bianchi, A.T., Steverink, P.J.G., 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine* 21, 1952–1957.
- van Dinten, L.C., Wassenaar, A.L., Gorbalenya, A.E., Spaan, W.J., Snijder, E.J., 1996. Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products

- containing the putative viral polymerase and helicase domains. *J. Virol.* 70, 6625–33.
- van Woensel, P.A., Liefkens, K., Demaret, S., 1998a. Effect on viraemia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus. *Vet. Rec.* 142, 510–2.
- van Woensel, P.A., Liefkens, K., Demaret, S., 1998b. European serotype PRRSV vaccine protects against European serotype challenge whereas an American serotype vaccine does not. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 713–8.
- Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P.A., Nauwynck, H.J., 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 77, 8207–15.
- Vanhee, M., Delputte, P.L., Delrue, I., Geldhof, M.F., Nauwynck, H.J., 2009. Development of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus-neutralizing antibodies. *Vet. Res.* 40.
- Villanova, G. V, Gardiol, D., Taborda, M.A., Reggiardo, V., Tanno, H., Rivadeneira, E.D., Perez, G.R., Giri, A.A., 2007. Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3555–63.
- Wagstrom, E.A., Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., 2001. Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1876–80.
- Wang, X., Eaton, M., Mayer, M., Li, H., He, D., Nelson, E., Christopher-Hennings, J., 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch. Virol.* 152, 289–303.
- Wasilk, A., Callahan, J.D., Christopher-Hennings, J., Gay, T.A., Fang, Y., Dammen, M., Reos, M.E., Torremorell, M., Polson, D., Mellencamp, M., Nelson, E., Nelson, W.M., 2004. Detection of U.S., Lelystad, and European-Like Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses and Relative Quantitation in Boar Semen and Serum Samples by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4453–4461.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13, 121–30.
- White, D., Rotolo, M., Olsen, C., Wang, C., Prickett, J., Kittawornrat, A., Panyasing, Y., Main, R., Rademacher, C., Hoogland, M., Zimmerman, J.J., 2014. Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *J Swine Heal. Prod.* 22, 138–141.
- Whitworth, K.M., Rowland, R.R.R., Ewen, C.L., Tribble, B.R., Kerrigan, M.A., Cino-Ozuna, A.G., Samuel, M.S., Lightner, J.E., McLaren, D.G., Mileham, A.J., Wells, K.D., Prather, R.S., 2015. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat. Biotechnol.* 34, 20–22.
- Williams, G.A., Stone, E.C., 1941. Testing Saliva and Urine Samples: For the Detection of Drugs Used to Stimulate Race Horses. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 5, 243–6.
- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., Hoffman, L.J., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., 1997b. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion.

- Vet. Microbiol. 57, 69–81.
- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.-J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., 1997c. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet. Microbiol.* 55, 231–240.
- Wills, R.W., Doster, A.R., Galeota, J.A., Sur, J., Osorio, F., 2003. Duration of Infection and Proportion of Pigs Persistently Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Duration of Infection and Proportion of Pigs Persistently Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Clin Microbiol.* 41, 58-62.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741–3751.
- Wissink, E.H.J., Kroese, M.V., van Wijk, H.A.R., Rijsewijk, F.A.M., Meulenber, J.J.M., Rottier, P.J.M., 2005. Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 79, 12495–506.
- Wu, W.-H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R.R., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., 2001. A 10-kDa Structural Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Encoded by ORF2b. *Virology* 287, 183–191.
- Wu, W.-H., Fang, Y., Rowland, R.R., Lawson, S.R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.-J., Nelson, E.A., 2005. The 2b protein as a minor structural component of PRRSV, *Virus Research*.
- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P., 2004. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J. Virol.* 78, 5923–33.
- Yoon, I.J., Joo, H.S., Christianson, W.T., Kim, H.S., Collins, J.E., Morrison, R.B., Dial, G.D., 1992. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 144–7.
- Yoon, I.J., Joo, H.S., Goyal, S.M., Molitor, T.W., 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 289–92.
- Yoon, K.J., Wu, L.L., Zimmerman, J.J., Hill, H.T., Platt, K.B., 1996. Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol.* 9, 51–63.
- Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Chang, C.C., Cancel-Tirado, S., Harmon, K.M., McGinley, M.J., 1999. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. *Vet. Res.* 30, 629–38.
- Zhang, Q., Yoo, D., 2015. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Vet. Microbiol.* 177, 229–241.
- Zimmerman, J., 2003a. Historical overview of PRRS virus., in: Zimmerman, J., Yoon, K.J., Neumann, E. (Ed.), *PRRS Compendium*. National Pork Board, Pork Checkoff, pp. 1–7.
- Zimmerman, J., 2003b. Epidemiology and ecology., in: Zimmerman, J. J., Yoon, K., Neumann, E. (Ed.), *PRRS Compendium*. National Pork Board, Pork Checkoff, pp. 27–34.
- Zuckermann, F.A., Garcia, E.A., Luque, I.D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M., Osorio, F., 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of

gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet. Microbiol.* 123, 69–85.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

La hipòtesi que es planteja en la present tesi és que en granges amb un programa d'estabilització establert i ja amb baixes prevalences d'infecció en els animals de les maternitats, petites pèrdues d'eficiència diagnòstica degudes al mostreig, recollida, transport, emmagatzematge, processament, mètodes d'extracció de l'RNA o en la PCR usant fluids orals, podrien conduir a pèrdues de sensibilitat diagnòstica rellevants. A partir d'aquesta hipòtesi proposem:

1. Conèixer la dinàmica d'excreció en fluids orals del virus del PRRS1 en animals infectats amb o sense immunitat prèvia.
2. Determinar les condicions òptimes del material de recollida de fluids orals així com les condicions d'emmagatzematge i processament.
3. Determinar la importància dels procediments d'extracció de l'RNA i dels reactius de PCR que s'empren més habitualment en relació a l'eficiència de la detecció del virus del PRRS en mostres de fluids orals.
4. Determinar, a partir de les estimacions realitzades en els objectius anteriors, l'eficàcia de l'ús de fluids orals per al monitoratge de garrins de transició en situacions de baixa prevalença (granges estables o properes a l'estabilitat).

PART II:

Estudis

ESTUDI 1: *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) shedding in oral fluids of naïve and vaccinated pigs exposed to the wild-type genotype 1 virus.

1. Introduction

Nowadays, the detection of PRRS virus using oral fluids (OF) by qRT-PCR is becoming an important tool for monitoring the herd. Also, from a scientific point of view, the detection and quantification of viral shedding is important to understand the transmission. The main advantages of OF are the easiness of collection, respecting animal welfare, and the fact that by being an aggregate sample a better representation of the herd can be obtained examining less samples.

The studies about OF shedding show differences between PRRSV1 and PRRSV2 in the duration of excretion and in the quantity of virus. The north American PRRSV is detected sooner and with a higher viral load in OF than European one (Decorte *et al.*, 2015; Kittawornrat *et al.*, 2010). However, the greater part of the articles dealing with detection of PRRSV in OF have been performed in North American conditions with PRRSV2 (Prickett *et al.*, 2008b; Ramirez *et al.*, 2012). Additionally, for comparing OF and serum samples for diagnostic evaluation, the main difficult is obtaining individual samples from growing pigs. Thus, the majority of the studies either use individual OF samples from adult animals or OF pen-based samples from growing pigs (Gerber *et al.*, 2013; Prickett *et al.*, 2008a)

In addition, the previous studies use the inoculation or vaccination animal model for assessing the individual PRRSV OF shedding in experimental conditions (Gerber *et al.*, 2013; Kittawornrat *et al.*, 2010; Prickett *et al.*, 2008a). Therefore, this study consider the individual OF shedding in growing pigs for inoculated, natural infected and natural infected vaccinated animals for PRRSV1. Besides OF samples are compared to serum in terms of sensitivity.

2. Materials and methods

The evaluation of viral shedding in OF was done in the frame of an experiment performed to assess the transmission of PRRSV to vaccinated and for vaccinated pigs (Pileri *et al.*, 2017).

2.1 Ethics statement

The experiment was done under permission of the Ethics Committee for Human and Animal Experimentation at the *Universitat Autònoma de Barcelona* and by the Commission for Animal Experimentation at the *Departament de Medi Ambient i Habitatge* (nº 5796) of the Autonomous Catalan Government.

2.2 Animals, housing, and oral fluid collection

Forty three-week-old piglets (Landrace x Pietrain) were obtained from a PRRSV and Aujeszky's disease virus negative farm. Animals were vaccinated just before weaning (3 weeks of age) against *Porcine circovirus type 2* (PCV2) and *Lawsonia intracellularis* using commercially available vaccines.

After arrival to the experimental farm, piglets were ear-tagged and left to acclimatize for 1 week. Then, pigs were randomly divided in two groups, vaccinated (V, n=14) and non vaccinated animals (NV, n=26), housed separately. On day 0, V pigs were administered intramuscularly a 2 mL dose of a commercial modified live PRRSV vaccine (MLV) (PORCILIS® PRRS, MSD Animal Health) according to the directions of the manufacturer. At 30 days post-vaccination (DPV), 20 NV animals were moved to an isolated room and inoculated intra-nasally with 2 mL (1 mL/nostril) of a suspension containing $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL of wild-type PRRSV1 strain 3267 (GenBank accession number JF276435) used in previous studies (Darwich *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b; Gimeno *et al.*, 2011; Pileri *et al.*, 2015). Overall nucleotide similarity (Open Reading Frames 1-7) between challenge and vaccine virus was 93.4% (Darwich *et al.*, 2011). The inoculated NV animals were designated then onwards as "seeder" pigs (S). Two days later (32 DPV), each S pig was allocated with one NV (n=6) or one V (n=14) in one-to-one pens, leading to fourteen replicas for S and V pigs, and six replicas for S and NV animals (Figure 1).

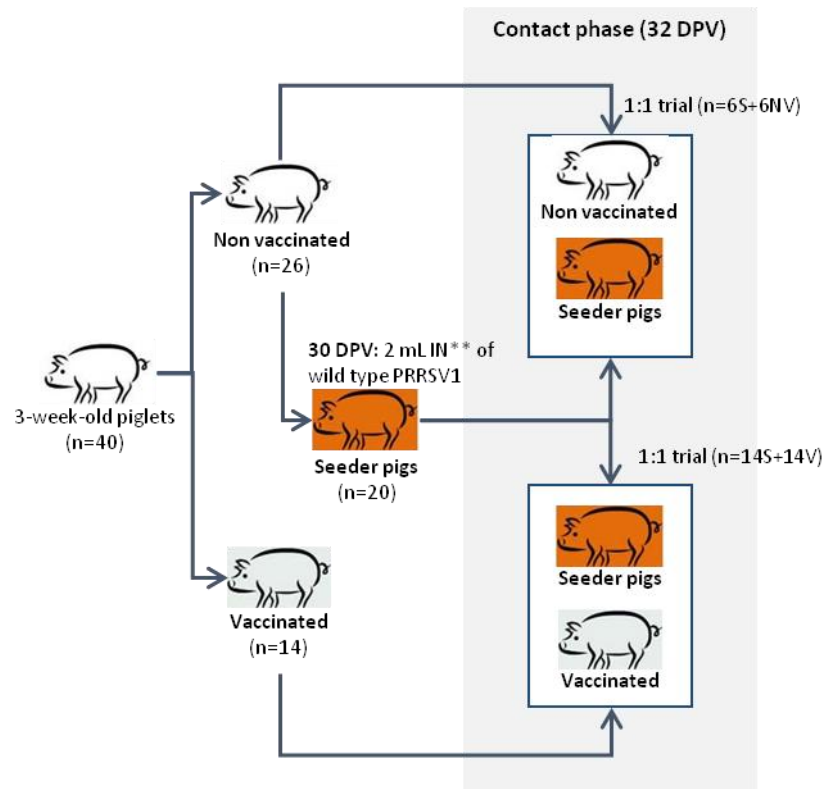


Figure 1. (Figure modified from Pileri *et al.* (2017)). Forty three-week-old piglets were divided in two groups, vaccinated (V) and non vaccinated (NV). V pigs (n=14) were vaccinated with a commercial MLV PRRSV vaccine while NV (n=26) were kept as controls. Thirty days later, 20 NV pigs were separated in a different place and were inoculated intra-nasally with the wild-type PRRSV1 isolate 3267 (now on seeder pigs or S). In parallel, the remaining NV and all V animals were individually distributed in pens. Two days later, namely at 32 days post-vaccination S pigs were mixed 1:1 with either an NV (six 1:1 replicas) or a V (fourteen 1:1 replicas). This was the start of the contact phase which longer until 26 days for S and NV pigs and 31 days for V pigs.

2.3 Collection and processing of samples

Blood samples were taken the day of vaccination to confirm the PRRSV-negative status of the animals. Then, pigs were bled at 14 and 30 DPV to assess seroconversion. OF and blood samples were collected at 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24 and 26 days after introduction of the S pigs, for S and NV pigs and, until 31 days for V pigs. All pigs were euthanized and necropsied sequentially during the last days of the experiment. Samples of tonsils were collected and stored at -80°C until examined for the presence of virus.

Individual OF were collected using an OF collection device (Salivette[®], Sarstedt AG & Co.). Previously, in order to minimize handling of pigs and increasing the amount of OF

collected, pigs were trained twice a week during the vaccination phase for chewing Salivette® devices flavored with apple juice and apples as a reward. Once they were trained, the pigs chewed the device when presented (Supplementary file S1). During the experiment the unflavored Salivettes® were left into the mouth of the pig for one minute or until the cotton was completely soaked. Then, the piglet received an apple as a reward. A specific restraining snare, needle, blood tube and clamps for holding Salivette® devices were used for each animal. Besides this, biosecurity measures were taken to avoid other forms of transmission.

2.4 PRRSV RNA extraction and detection via qRT-PCR

Salivette® devices were stored in ice until sent to the laboratory. Then, they were centrifuged at 1,000 g for 1 minute. OF were recovered from the bottom of the Salivette® tube and stored at -80°C until analyzed. RNA was extracted with NucleoSpin® RNA Virus extraction kit (Macherey-Nagel), and qRT-PCR was performed with a commercial mix One-Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems). Primers and probe were designed specifically for the ORF7 of isolate CReSA 3267 (Forward primer: 5'-ATCAAGGCGCAGGAACTGCGTCG-3'; Reverse primer: 5'-TAATTTGCACCCTGACTGGC-3' and TaqMan probe: 5'-6FAM-TCATACAGTGCGCCTGATTC-TMR-3'). A series of decimal dilutions (10^0 - 10^7 genomic copies) of a standard (ORF7 amplicon) were included.

Sera were obtained by centrifugation at 1,500 g for 10 minutes and aliquots that were not analyzed immediately were stored at -80°C. RNA was extracted with BioSprint® 96 One-For-All Vet (Qiagen) and qRT-PCR was processed similarly to OF.

Extraction of viral RNA from tonsils was done using the Total RNA isolation Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel), following manufacturer directions and starting with 1 mg of tissue. The presence of virus in tissues was also determined by qRT-PCR as above.

2.5 Statistical analysis

Statistical analyses were done in order to compare viral loads of S, NV and V pigs using StatsDirect v.3.0.179. EpiCalc 2000 version 1.02 was used for interval of confidence and Cohen's kappa coefficient was calculated for serum and OF agreement. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Dynamics of PRRSV OF shedding

Figure 2 shows the proportion of animals with viral shedding in OF for each group and the viral load for each time point. Figure 3 shows the individual pattern of shedding across time. Shedding was expressed as the \log_{10} genomic equivalents (GE) per mL of OF. This was calculated by using the Ct value in the regression line obtained with the quantitative positive control. The pattern of shedding was expressed in days post-inoculation (DPI) for S and in days post-contact (DPC) for NV and V pigs.

According to figures 2A and 3A all S pigs rapidly developed viremia, 20/20 at 2 DPI. In OF, at day 2 after inoculation 18/20 (90%; $CI_{95\%}$: 66.9%-98.3%) and at 5 DPI, 20/20 were detected as shedders. During the first 19 days post-inoculation almost all animals shed virus in OF and at day 23, 16/20 (80%; $CI_{95\%}$: 55.7%-93.4%) pigs were still shedding, while 14/20 (70%; $CI_{95\%}$: 45.7%-87.2%) were viremic.

For NV pigs, figures 2B and 3B, the shedding pattern was similar to S pigs taking into account the lag due to the time required to get the infection by contact. Thus, the maximum proportion of shedders was observed in the second week. For NV pigs, at 3 DPC in two cases virus was detected before in OF than in serum. At the end of the experiment, one above two pigs was still shedding without viremia.

In vaccinated animals the shedding behavior was different, as showed in Figures 2C and 3C. In V group, all animals became infected but at maximum 13/14 pigs (92.9 %; $CI_{95\%}$: 64.2%-99.6%) shed virus at a given moment and in the most of the animals shedding was intermittent.

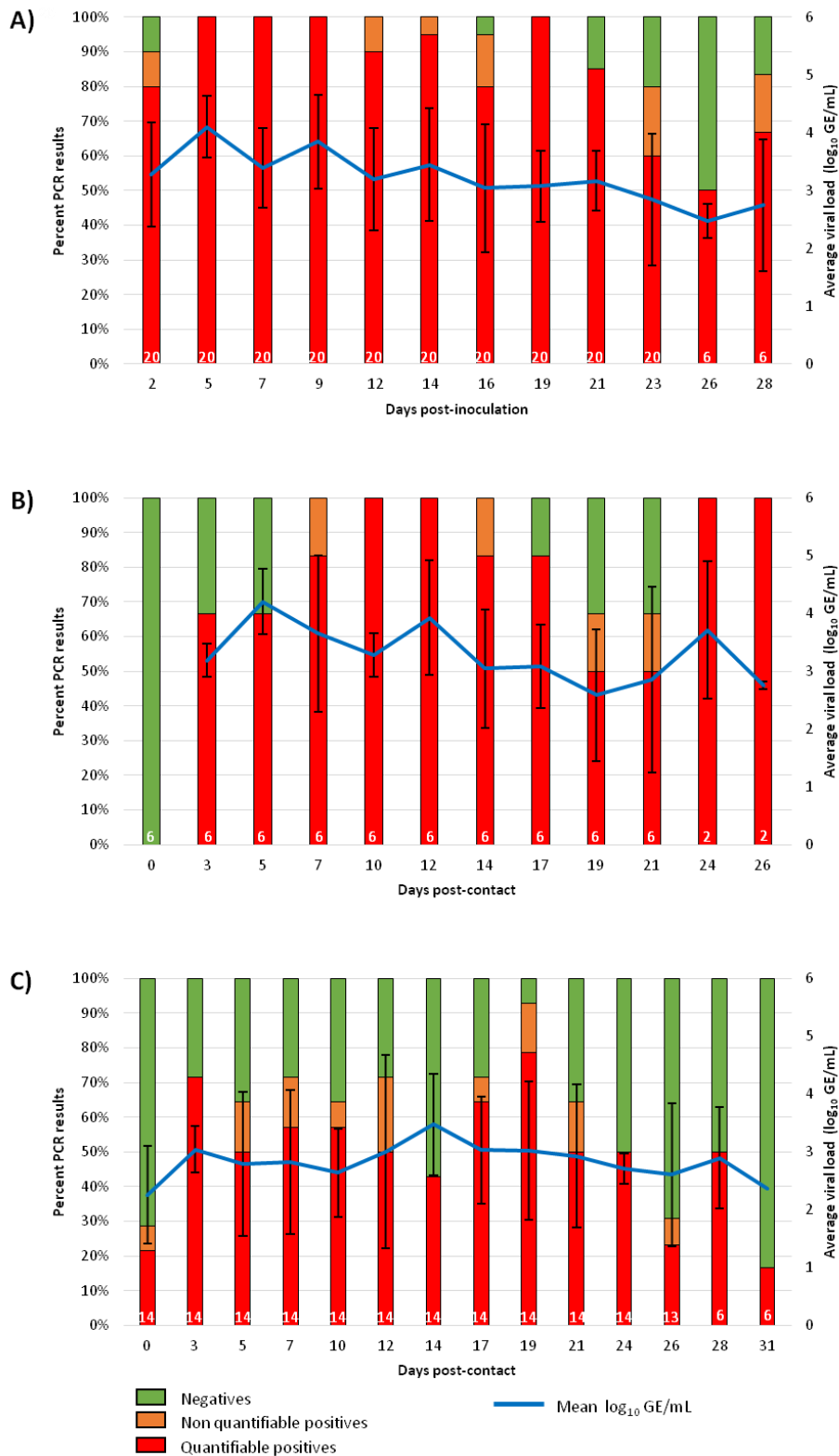


Figure 2. Average and standard deviation of viral load in oral fluids. The blue line depicts the average viral load expressed as \log_{10} GE/mL by days of sampling after inoculation. A) seeder pigs, B) non vaccinated pigs and C) vaccinated pigs. The bars show the proportion of negative, positive and non quantifiable positive results in green, red and orange, respectively. The number of total pigs sampled in each time point is shown in white.

A) Seeder pigs

Viremia

ANIMAL	2 DPI	5 DPI	7 DPI	9 DPI	12 DPI	14 DPI	16 DPI	19 DPI	21 DPI	23 DPI	26 DPI	28 DPI
601	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green
605	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
606	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	White	White
607	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
608	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
611	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green
612	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
614	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red
615	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
616	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
618	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
620	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
621	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
622	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
623	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
624	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	White	White
625	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	White	White
626	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green
627	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	White	White
631	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White

Oral fluids

ANIMAL	2 DPI	5 DPI	7 DPI	9 DPI	12 DPI	14 DPI	16 DPI	19 DPI	21 DPI	23 DPI	26 DPI	28 DPI
601	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
605	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
606	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	White	White
607	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
608	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
611	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red
612	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	White	White
614	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red
615	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	White	White
616	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Yellow	White	White
618	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	White	White
620	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
621	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
622	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Green	Green
623	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	White	White
624	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	White	White
625	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	White	White
626	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Yellow
627	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Green	Green	White	White
631	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	White

DPI = Days post-inoculation Negatives ■ Non quantifiable positives ■ Quantifiable positives ■

B) Non vaccinated pigs

Viremia

ANIMAL	0 DPC	3 DPC	5 DPC	7 DPC	10 DPC	12 DPC	14 DPC	17 DPC	19 DPC	21 DPC	24 DPC	26 DPC
604	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red		
610	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green		
619	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red		
628	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green		
630	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
632	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green

Oral fluids

ANIMAL	0 DPC	3 DPC	5 DPC	7 DPC	10 DPC	12 DPC	14 DPC	17 DPC	19 DPC	21 DPC	24 DPC	26 DPC
604	Green	Red	Green	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Green		
610	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow		
619	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green		
628	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red		
630	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Green	Green	Red	Red	Red
632	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red

C) Vaccinated pigs

Viremia

ANIMAL	0 DPC	3 DPC	5 DPC	7 DPC	10 DPC	12 DPC	14 DPC	17 DPC	19 DPC	21 DPC	24 DPC	26 DPC	28 DPC	31 DPC
635	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
636	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green
645	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red
646	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green
652	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red			
654	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green		
656	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red		
658	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green		
660	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green		
661	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red		
662	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green		
665	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red
666	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green		
668	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green

Oral fluids

ANIMAL	0 DPC	3 DPC	5 DPC	7 DPC	10 DPC	12 DPC	14 DPC	17 DPC	19 DPC	21 DPC	24 DPC	26 DPC	28 DPC	31 DPC
635	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
636	Red	Red	Red	Red	Green	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Red	Green
645	Green	Green	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green
646	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green
652	Yellow	Red	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red			
654	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red		
656	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red		
658	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green		
660	Green	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Green	Green	Green		
661	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red		
662	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green		
665	Green	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
666	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green		
668	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green

DPC = Days post-contact Negatives ■ Non quantifiable positives ■ Quantifiable positives ■

Figure 3. Individual patterns of viremia and oral fluid shedding by days after inoculation for A) seeder pigs; and B) non vaccinated and C) vaccinated pigs (days after contact). Negative, positive and non quantifiable positive results are shown in green, red and orange squares, respectively. Empty squares account for days when animals were not sampled.

Table 1 shows the periods of viremia and OF shedding as well as viral loads per group. The duration of shedding in OF was significantly lower in vaccinated ($P < 0.05$) compared to the other groups. However, for the viral loads there were no significant differences between groups. During the observed period viral load in OF of S and NV pigs was very similar in the range of 2.5-4.2 \log_{10} GE/mL, with a significant decrease over time ($r^2 = 0.59$; $p = 0.006$). Regarding V pigs viral load ranged from 2.3 to 3.5 \log_{10} GE/mL.

Table 1. Average of the duration of viremia and oral fluid shedding (days) and the range of viral load in serum and oral fluid (\log_{10} GE/mL) for seeder, non vaccinated and vaccinated pigs.

	Viremia	OF shedding	Serum viral load	OF viral load
Seeders (S)	21.4 (± 1.6)	23.5 (± 2.6)	3.8-6.5	2.5-4.1
Unvaccinated (NV)	15.2 (± 2.7)	18.0 (± 3.4)	3.7-7.1	2.6-4.2
Vaccinated (V)	8.6 (± 5.8)	12.3 (± 6.9)	3.1-5.2	2.3-3.5

*Average \pm standard deviation (range)

At necropsy, PRRSV was detected in the tonsils of all infected pigs with no differences in viral load among experimental groups (7.4 ± 2.5 and 8.2 ± 1.0 genomic copies/g of tissue for NV and V, respectively). Sequencing confirmed that the vaccine virus was not present in any tonsil of the pigs participating in the experiment.

3.2 Comparison of OF shedding *versus* viremia

Figure 4 compares the viral load in serum and oral fluids (\log_{10} GE/mL) for S, NV and V pigs across time. The quantity of virus was always higher in serum than in OF.

The Kappa value for the comparison of blood sampling and individual OF was 0.86 (IC_{95%}: 0.73-0.99) in S, 0.88 (IC_{95%}: 0.64-1.00) in NV and 0.68 (IC_{95%}: 0.59-0.83) in V pigs.

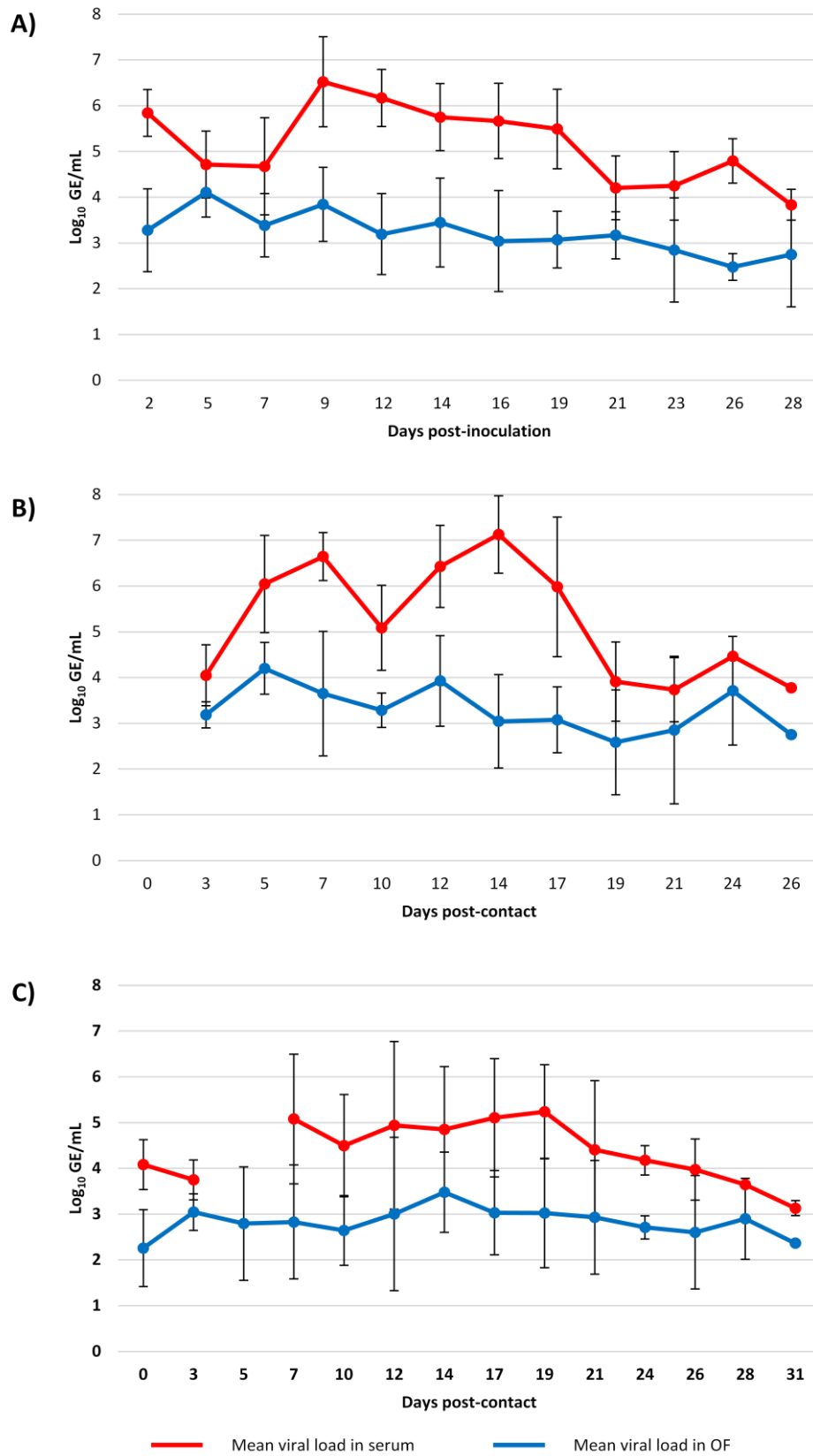


Figure 4. Average and standard deviation viral load expressed as log₁₀ GE/mL in serum (red line) and in oral fluid (blue line). A) seeder pigs, B) non vaccinated pigs and C) vaccinated pigs.

3.3 Oral fluid volume

Figure 5 shows the evolution of the volume of OF collected during the experiment. There were no differences between groups in OF volume collected (dates not shown).

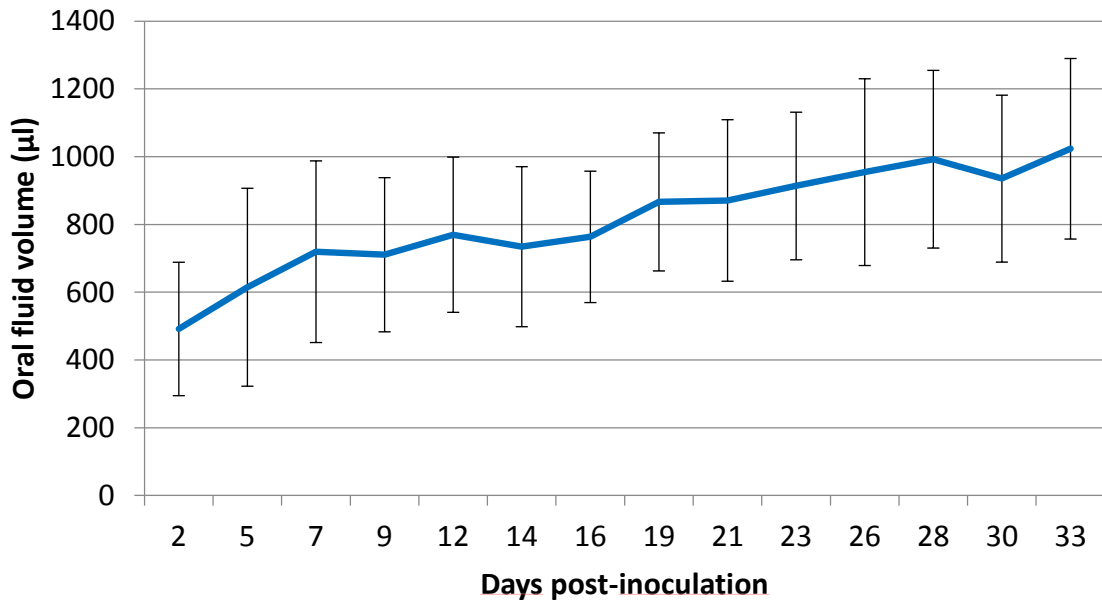


Figure 5. Average volume and standard deviation of oral fluid collected (µL).

4. Discussion

Based on our results, the pattern of PRRSV shedding in OF was slightly different in S compared to NV pigs. The fact that NV pigs shed virus for a shorter period compared to S suggests that results obtained in inoculation models tends to overestimate shedding; whether or not this is significant for transmission has to be examined yet. Assessment of shedding of PRRSV in OF can be of critical importance for the understanding of how the virus is transmitted.

In any case, for both, S and NV pigs, shedding in OF were constant for the whole viremic period and for some of the animals continued after the ceasing of viremia.

Moreover, the inoculated virus was detected in tonsils of all infected animals. This is probably a reflect of the replication of PRRSV in lymphoid tissues and reinforce the notion

that non-viremic pigs can be infectious (Bierk *et al.*, 2001; Horter *et al.*, 2002; Wills *et al.*, 2003).

In contrast, the decrease of the shedding in vaccinated pigs would be compatible with a decreased potential for transmission as noted in other studies (Charpin *et al.*, 2012; Pileri *et al.*, 2015). Interestingly, for S and NV pigs serum and oral fluids were equivalent in terms of diagnostic performance in contrast to the results obtained by Gerber *et al.* (2013). In vaccinated animals, the agreement between tests was lower as a certain result of the limited spreading of the virus.

During the study pigs showed a learning behaviour for chewing the Salivette® device according to the results of White *et al.* (2014) (Supplementary file S1). On the other hand, animals being at the peak of the infection chewed the cotton like others, according to the results of Decorte *et al.* (2015) and Kittawornrat *et al.* (2010). Nevertheless these results could be different in a pen-based OF collection.

In conclusion, OF is a reliable method for detecting PRRSV shedding and the prolonged detection of the virus could be useful in weaning monitoring programs. However, further research is needed in the sensitivity of pen-based OF samples and the role developed by shedding in OF in PRRSV transmission.

5. Acknowledgements

This work was funded by the Spanish *Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Agroalimentaria* (INIA) project RTA2011-00119-C0-00, FEDER and MSD Animal Health. Emanuela Pileri was supported by a PIF scholarship of *Universitat Autònoma de Barcelona*. Elisa Gibert Rebull was supported by a scholarship of INIA.

6. Appendix

Supplementary material: video S1.

7. References

- Bierk, M.D., Dee, S. a., Rossow, K.D., Otake, S., Collins, J.E., Molitor, T.W., 2001. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can. J. Vet. Res.* 65, 261–266.
- Charpin, C., Mahé, S., Keranflech, A., Belloc, C., Cariolet, R., Le Potier, M.F., Rose, N., 2012. Infectiousness of pigs infected by the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is time-dependent. *Vet. Res.* 43, 1–11.
- Darwich, L., Gimeno, M., Sibila, M., Diaz, I., de la Torre, E., Dotti, S., Kuzemtseva, L., Martin, M., Pujols, J., Mateu, E., 2011. Genetic and immunobiological diversities of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains. *Vet. Microbiol.* 150, 49–62.
- Decorte, I., Van Campe, W., Mostin, L., Cay, A.B., De Regge, N., 2015. Diagnosis of the Lelystad strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in individually housed pigs: comparison between serum and oral fluid samples for viral nucleic acid and antibody detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27, 47–54.
- Díaz, I., Gimeno, M., Darwich, L., Navarro, N., Kuzemtseva, L., López, S., Galindo, I., Segalés, J., Martín, M., Pujols, J., Mateu, E., 2012. Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Res.* 43, 30.
- Gerber, P.F., O'Neill, K., Owolodun, O., Wang, C., Harmon, K., Zhang, J., Halbur, P.G., Zhou, L., Meng, X.-J., Opriessnig, T., 2013. Comparison of commercial real-time reverse transcription-PCR assays for reliable, early, and rapid detection of heterologous strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected or noninfected boars by use of different. *J. Clin. Microbiol.* 51, 547–56.
- Gimeno, M., Darwich, L., Diaz, I., de la Torre, E., Pujols, J., Martín, M., Inumaru, S., Cano, E., Domingo, M., Montoya, M., Mateu, E., 2011. Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. Res.* 42, 9.
- Horter, D.C., Pogranichniy, R.M., Chang, C.-C., Evans, R.B., Yoon, K.-J., Zimmerman, J.J., 2002. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Microbiol.* 86, 213–28.
- Kittawornrat, A., Prickett, J., Chittick, W., Wang, C., Engle, M., Johnson, J., Patnayak, D., Schwartz, T., Whitney, D., Olsen, C., Schwartz, K., Zimmerman, J., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res.* 154, 170–6.
- Pileri, E., Gibert, E., Martín-Valls, G.E., Nofrarias, M., López-Soria, S., Martín, M., Díaz, I., Darwich, L., Mateu, E., 2017. Transmission of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 to and from vaccinated pigs in a one-to-one model. *Vet. Microbiol.* 201, 18–25.
- Pileri, E., Gibert, E., Soldevila, F., García-Saenz, A., Pujols, J., Diaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martín, M., Mateu, E., 2015. Vaccination with a genotype 1 modified live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus significantly reduces viremia, viral shedding and transmission of the virus in a quasi-natural experimental model. *Vet. Microbiol.* 175, 7–16.
- Prickett, J., Simer, R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.-J., Evans, R.B., Zimmerman, J.J., 2008a.

- Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 156–63.
- Prickett, J.R., Kim, W., Simer, R., Yoon, K.-J., Zimmerman, J., 2008b. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Heal. Prod* 16, 86–91.
- Ramirez, A., Wang, C., Prickett, J.R., Pogranichniy, R., Yoon, K.-J., Main, R., Johnson, J.K., Rademacher, C., Hoogland, M., Hoffmann, P., Kurtz, A., Kurtz, E., Zimmerman, J., 2012. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev. Vet. Med.* 104, 292–300.
- White, D., Rotolo, M., Olsen, C., Wang, C., Prickett, J., Kittawornrat, A., Panyasing, Y., Main, R., Rademacher, C., Hoogland, M., Zimmerman, J.J., 2014. Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *J Swine Heal. Prod* 22, 138–141.
- Wills, R.W., Doster, A.R., Galeota, J. a, Sur, J., Osorio, F. A., 2003. Duration of Infection and Proportion of Pigs Persistently Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Duration of Infection and Proportion of Pigs Persistently Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Clin Microbiol*, 41: 58-62.

ESTUDI 2: Comparison of protocols for the analysis of type 1 *porcine reproductive and respiratory syndrome* virus by RT-PCR using oral fluids.

1. Introduction

Oral fluids (OF) have shown to be simple, feasible and reliable samples for the diagnosis of human and animal diseases (Prickett and Zimmerman, 2010). The main advantages of OF sampling in animals compared to blood collection are, the reduction in labour, the possibility of testing a large number of individuals in an aggregate sample, and the fact that samples can be collected without the need for restraining and bleeding the animals. In the specific case of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV), OF are an interesting sample also for detecting infected animals even weeks after the end of viremia (Decorte *et al.*, 2015; Kittawornrat *et al.*, 2010; Pileri *et al.*, 2017). These animals are potential seeders and may play a role in the transmission of the virus during long periods of time (Bierk *et al.*, 2001). As a result, OF are increasingly used as a medium for the diagnosis and monitoring of PRRSV infection.

PRRSV, belonging to the *Arteriviridae* family, is shed in OF (Wills *et al.*, 1997b), although it is not fully known if this shedding is similar for both the PRRSV1 and PRRSV2 isolates, or if the pattern of shedding is the same for both species (Decorte *et al.*, 2015; Kittawornrat *et al.*, 2010). Beyond that, several conditions during the collection, shipment, storage, and analysis of the sample may influence the efficiency of the diagnosis. The contamination of samples by feedstuff or faeces, the physical characteristics of the sample, and the composition of the OF can be mentioned as potential sources of decreased efficiency of qRT-PCR using this type of sample (Ochert *et al.*, 1994). It is also known that the materials used for sampling (Olsen *et al.*, 2013a), the storage conditions (Prickett, 2009), and the RNA extraction methods (Chittick *et al.*, 2011; Decorte *et al.*, 2013), can influence the PCR results.

A review of the available literature on this topic shows that the conditions assumed to be optimal for the diagnostic process of PRRSV using OF have changed, as the knowledge in this area has increased (Kittawornrat *et al.*, 2010; Olsen *et al.*, 2013a; Ramirez *et al.*, 2012). At present, different laboratories have developed different protocols for storage, handling and processing OF, and commercial kits or in-house PCRs are selected according to different criteria, with convenience being an important factor for that selection.

The present study focuses on the evaluation of several elements, from the collection of OF through the storage and processing conditions, and the RNA extraction methods and PCR mixes, in order to present a proposal for an optimized protocol for the detection of PRRSV1 in OF.

2. Materials and methods

2.1 Oral fluid and virus used

Oral fluid samples were collected using a raw cotton rope in several pens of a nursery in a PRRSV-negative farm. The collected samples were tested using a commercial qRT-PCR kit (LSI VetMAX[®] PRRSV EU/NA, Life Technologies, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4468465>) in order to confirm that they were free of PRRSV. Then, the OF from different pens were pooled and used in all experiments. Aliquots of the pooled OF were spiked with PRRSV1 isolate 3267 (Darwich et al., 2011; Díaz et al., 2012; Gimeno et al., 2011; Pileri et al., 2015) (GenBank accession number JF276435) from 10^0 up to 10^4 or 10^5 median tissue culture infective dose (TCID₅₀/mL), as needed, depending on the experiment. The TCID₅₀ was determined by the titration of the 3267 isolate in pulmonary alveolar macrophages (PAM), followed by staining with monoclonal antibody (Mab) 1CH5 (a protein antitype 1 PRRSV, Ingenasa), and revealed with immunofluorescence (IF) technique.

2.2 Evaluation of different matrices for collecting OF and effect of storage conditions

Three different collection matrices were evaluated: untreated cotton ropes, untreated cotton gauzes, and Salivette[®] devices (Sarstedt AG & Co.). Collected materials were soaked for one minute in the spiked OF (nine replicas per material, using a decimal series of virus concentrations from 10^0 to 10^5 TCID₅₀/mL) and were then centrifuged at 800 g for 5min in order to recover the collected OF. Three of the replicates were analysed immediately, three were kept at 4°C for 24h, and three were stored frozen at -80°C for 24h. In all cases, RNA extraction was performed using a commercial silica-based kit, NucleoSpin[®] RNA virus extraction kit (Macherey-Nagel), and real-time PCR was performed using a commercial mix (One-Step RT-PCR Master Mix; Applied Biosystems). Primers and

probe were targeted to ORF7, and were specifically designed for the isolate 3267 in order to avoid losses of efficiency related to potential mismatches (Forward primer: 5'-ATCAAGGCGCAGGAACTGCGTCG-3'; Reverse primer: 5'-TAATTTGCACCCTGACTGGC-3' and TaqMan probe: 5'-6FAM-TCATACAGTGCGCCTGATTC-TMR-3'). A standard made from a purified ORF7 amplicon of isolate 3267 (544bp) was included in triplicate (from 10^0 to 10^7 genomic equivalents/tube). Three positive and negative extraction control samples were included in every round, as well as blank samples. Reactions were validated only if r^2 for the standard was above 0.98, the slope was in the interval -3.15 to -3.6, and the standard deviation for the resulting Ct for a given dilution of the standard was, on average, below 0.6. The detection limit was expected to be $\leq 10^1$ genomic equivalents/tube for the controls.

2.3 Centrifugation conditions and storage time

New aliquots of the OF were taken and spiked with different virus amounts as shown above. Each aliquot, corresponding to a given viral concentration, was divided into three portions; the first was used immediately, the second was stored for 24h at 4°C, and the third was stored for 72h at the same temperature. After the scheduled period of storage, the aliquot was subdivided into three portions that were centrifuged at 15,000 g for 15min, at 1,000 g for 10min, or directly examined without centrifugation. The supernatants of each treatment were then recovered and the RNA was extracted and analyzed by qRT-PCR. However, due to discontinuing the use of the qRT-PCR mix used before (One-Step RT-PCR Master Mix), the AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Life Technologies) was used instead. All combinations were tested in triplicate.

In order to have a more precise evaluation of the impact of the centrifugation on the diagnostic performance with samples containing low amounts of virus, 30 OF containing 10^1 TCID₅₀/mL and 30 samples containing 10^0 TCID₅₀/mL were then prepared. Each group of 30 replicates was divided into two sets (15 replicates each). One set of samples was centrifuged at 15,000 g for 15min, and the other was kept as a control.

2.4 Comparison of RNA extraction methods and commercial mixes for qRT-PCR

In this section of the study, six different RNA extraction systems were compared: the TRIzol® LS Reagent (ThermoFisher) as a reference method, BioSprint® 96 One-For-All Vet (Qiagen), and MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit (ThermoFisher) as magnetic-based separation methods, with NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel), PureLink® Viral RNA/DNA Kit (ThermoFisher), and High Pure Viral RNA Kit (Roche) as silica-based methods. Decimal dilutions of the isolate 3267 in OF (from 10⁴ up to 10⁰ TCID₅₀/mL) were divided into six groups of nine replicates, one for each RNA extraction method to be tested. Samples were centrifuged at 15,000 g for 15min and the supernatant was recovered for analyse. Extractions were performed following the instructions provided with each kit or reagent. For the elution of extracted RNA, the lowest volume suggested by the manufacturer was always chosen. Real time-PCR was performed in parallel with AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit and LSI VetMAX PRRSV EU/NA using the same extracted RNA. In the case of LSI VetMAX® PRRSV EU/NA, the commercial mix includes a set of primers.

Because of the different nature of the examined RNA extraction systems and the different protocols, it was not possible to adjust the amount of total RNA per reaction tube in order to have an equal number of copies per qRT-PCR tube based on spectrophotometric or similar methods. Accordingly, the process took place following manufacturers' recommendations. To account for the differences when comparing the results, the regression line resulting from the obtained Ct values using each extraction kit and qRT-PCR was calculated first (GraphPad Prism, Version 5.01). It was also tested to see if a single regression could fit results from different RNA extraction kits for a given qRT-PCR mix. The efficiency of the qRT-PCR for each mix and extraction kit was then obtained by introducing the slope value into the qPCR Efficiency Calculator program (ThermoFisher Scientific), which uses the following formula: Efficiency = 10^(-1/slope).

Considering the calculated efficiencies, the theoretical performance of the qRT-PCR was then reconstructed according to the following formula: Number of copies of the product (amplicons) at a given cycle n equals to 2^{(efficiency)*n}.

At the same time, the results of the control plasmid with each mix helped to determine, without the effect of the extraction kit, at what cycle one single copy of the plasmid/tube could be detected. Knowing the efficiency of the qRT-PCR for the plasmid, it was possible to calculate how many amplicons were necessary to produce a signal that could be discriminated from noise. This was considered as the detection limit for the thermocycler sensor (7500 Fast Real Time PCR System, Life Technologies) using the selected qRT-PCR mixes. Accordingly, for each kit and qRT-PCR mix, it was assessed when the required threshold would be achieved using the different RNA extraction kits with a sample containing one genomic equivalent per tube. Since every RNA extraction kit used different volumes of sample and elution, it was then calculated what concentrations of virus present in an OF sample (genomic equivalents/mL) would result in one GE tube using the recommended protocol.

2.5 Statistical methods

Descriptive statistics were calculated using StatsDirect v.3.0.179. Regression lines were constructed after the Ct versus TCID₅₀ in the sample or the expected genomic equivalents. Slopes of the different regression lines were compared in a linear mixed model. Comparison of means was made using the Kruskal-Wallis test. Statistical significance was set at P<0.05.

3. Results

3.1 Evaluation of different matrices for collecting OF and effect of storage condition

For a given storage condition, cotton ropes, gauzes or Salivette® devices produced similar results (non-significant differences). The results were not affected by the use of refrigeration at 4°C, or freezing during the first 24h after preparation of the samples (not shown).

3.2 Centrifugation conditions and storage time

Regardless of the centrifugation treatment (Figure 1), all samples stored for 72h yielded negative qRT-PCR results for the 10^0 TCID₅₀/mL dilutions. In contrast, when samples were stored for up to 24h at 4°C, most of the 10^0 samples were positive, although some non-centrifuged ones were negative. Interestingly, when fresh OF were examined, only samples centrifuged at 15,000 g for 15min yielded positive result for 10^0 samples.

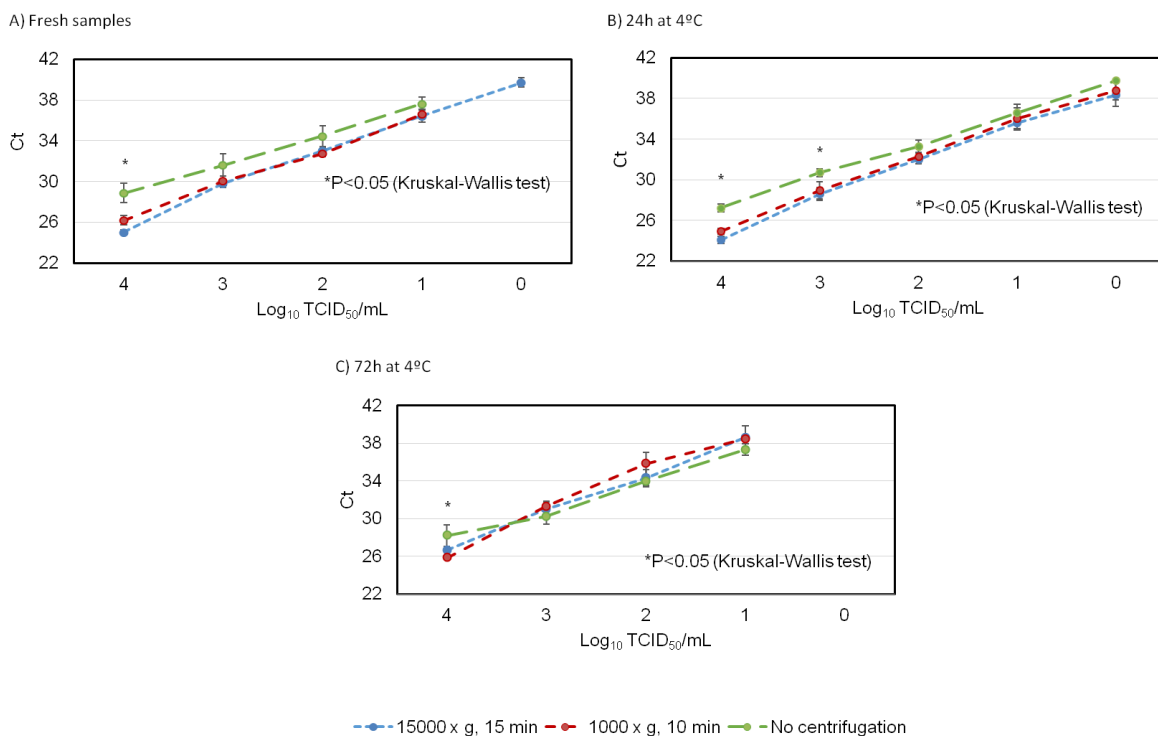


Figure 1. Concentration of the samples expressed as log₁₀ TCID₅₀/mL and Ct value of qRT-PCR detection. A) fresh samples, B) oral fluids conserved at 4°C during 24h and C) oral fluids conserved at 4°C during 72h. Significant differences (Kruskal-Wallis test) are indicated by means of an asterisk.

In order to further clarify the effect of centrifugation, a larger set of 30 samples spiked at 10^0 or 10^1 TCID₅₀/mL were examined after 24h at 4°C, with or without centrifugation at 15,000 g for 15min. Figure 2 shows the distribution of results for each sample and group. For the 10^1 TCID₅₀/mL spiked samples, PCR results were positive in 15/15 centrifuged OF and in 14/15 non-centrifuged samples. The mean Ct was 34.6 ± 0.3 and 38.2 ± 0.7 , respectively ($P < 0.05$). At 10^0 TCID₅₀/mL, all centrifuged samples were detected as positive

(15/15, 100%; $CI_{95\%}$: 74.7-100%), while only 1/15 (6.7%; $CI_{95\%}$: 0.4-34.0%) non-centrifuged samples produced a detectable signal ($P < 0.05$). The mean Ct for centrifuged samples was 38.0 ± 0.6 .

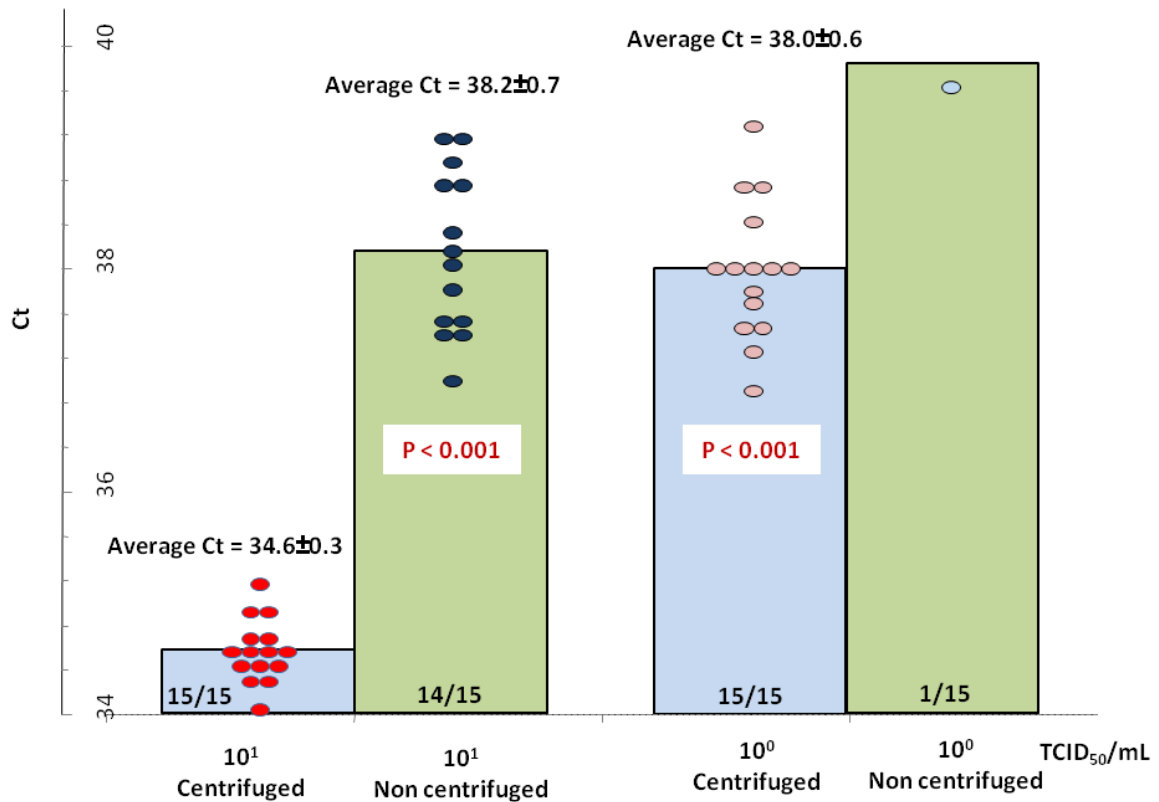


Figure 2. Distribution of the results (Ct) for 10^1 and 10^0 TCID₅₀/mL spiked OF samples subjected to centrifugation at 15,000 x g for 15min or processed without centrifugation.

3.3 Comparison of RNA extraction methods and commercial mixes for RT-PCR

Table 1 shows the parameters of the regression lines for each combination examined, taking into account the TCID₅₀ present per reaction tube according to the sample and elution volumes of the extraction and the RNA volume added in the qRT-PCR. With qRT-PCR mixes, the comparison of the regression lines indicated that they were not similar, and that a single regression cannot fit all the results.

Table 1. Parameters of the regression lines for each combination of extraction kit and PCR mix. The values were obtained by using the concentration of virus (TCID₅₀/mL) versus the Ct obtained.

PCR mix	Kit	R ²	Slope (mean)	CI _{95%} slope	PCR Efficiency (%)*	Y-intercept**
AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit	TRizol	0.986	-3.35	-3.473;-3.231	98.74	29.62
	NucleoSpin	0.988	-3.45	-3.568;-3.329	95.00	33.03
	BioSprint	0.988	-3.47	-3.582;-3.348	91.84	32.23
	MagMAX	0.988	-3.43	-3.547;-3.316	95.62	31.11
	HighPure	0.978	-3.46	-3.624;-3.304	94.26	31.88
	PureLink	0.980	-3.52	-3.677;-3.369	92.23	32.19
LSI VetMAX PRRSV EU/NA	TRizol	0.984	-3.19	-3,319;-3,066	105.68	28.64
	NucleoSpin	0.968	-3.30	-3,483;-3,114	100.90	31.88
	BioSprint	0.962	-3.28	-3,484;-3,084	98.87	31.42
	MagMAX	0.957	-3.23	-3,44;-3,018	104.03	30.13
	HighPure	0.962	-3.36	-3,565;-3,152	98.48	31.49
	PureLink	0.966	-3.32	-3,509;-3,124	100.23	32.22

*efficiency was calculated after the slope using the formula: Efficiency = $10^{(-1/\text{slope})}$.

** Y-intercept show the expected Ct at the detection limit (calculated as TCID₅₀).

According to the values of the regression line obtained with the plasmids, it was calculated, for the conditions and reagents used in the present study, that the thermocycler was able to detect a positive signal when about 10^{10} specific amplicons were present in the tube. This occurred at Ct=36-37 when one initial copy of the control plasmid was added to the tube with both PCR mixes. This baseline allows comparing the limit of detection of different RNA extraction methods that means at which Ct each RNA extraction method reached 10^{10} amplicons.

Having calculated the efficiencies (after the slope) for each combination of RNA extraction method and PCR mix, the number of amplicons produced for a single genomic equivalent (GE)/tube could be calculated for each PCR cycle. Considering 10^{10} specific amplicons as the point at which the thermocycler could distinguish a specific product from the background, it was predicted that for the AgPath™ 1 GE/tube will result in a Ct<40 for 4 out of 6 RNA extraction methods, while BioSprint® and PureLink® would be above this value. With LSI VetMAX®, it was predicted that all extraction methods would result in a detectable signal at Ct<40 when the tube contained 1 GE (Figures 3 and 4).

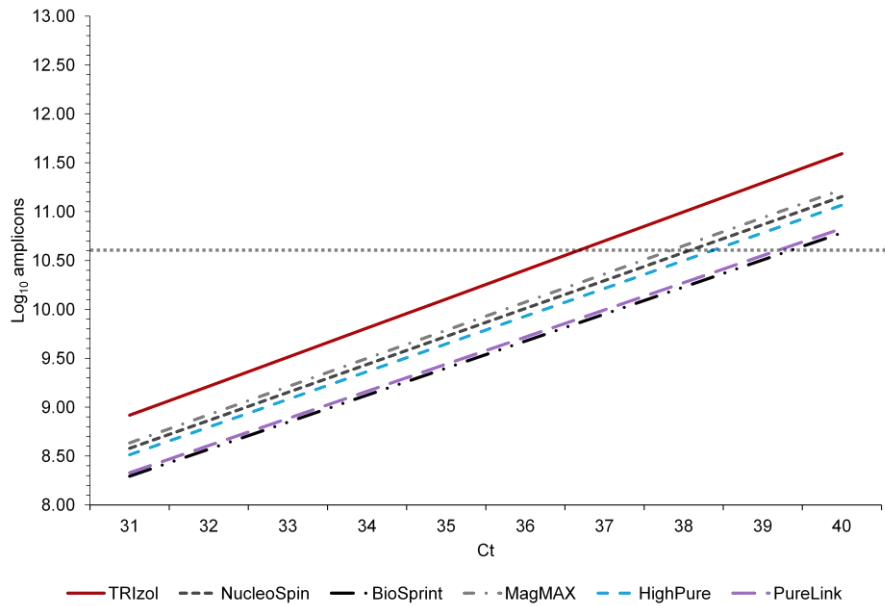


Figure 3. Theoretical number of amplicons (\log_{10} , y-axis) resulting from 1 copy of PRRS virus RNA genome per tube as calculated from the efficiency of PCR reaction depending on the extraction system for the AgPath™ PCR mix. The x-axis shows the cycles of the reaction (Ct). The dashed horizontal line shows the expected point at which the thermocycler would be able to discriminate the specific signal from background.

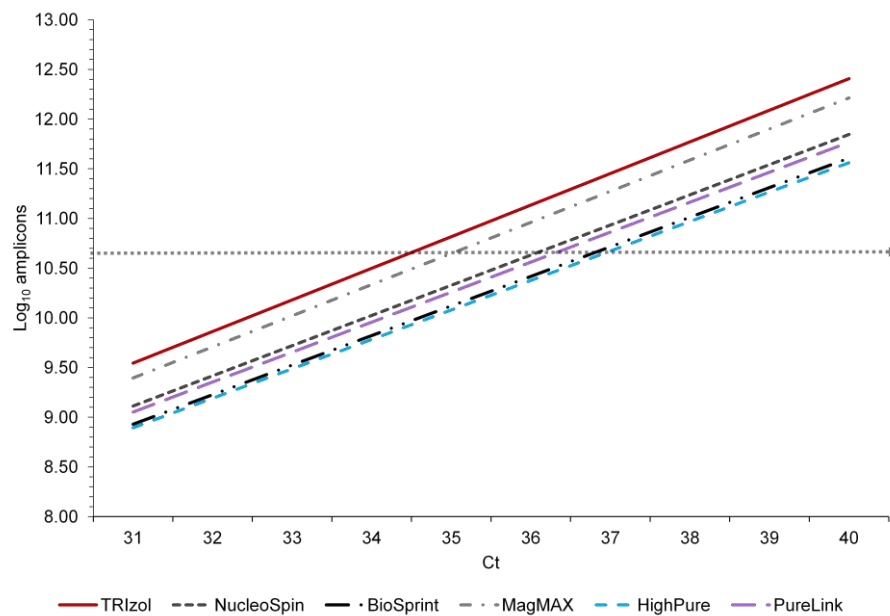


Figure 4. Theoretical number of amplicons (\log_{10} , y-axis) resulting from 1 copy of PRRS virus RNA genome per tube as calculated from the efficiency of PCR reaction depending on the extraction system for the LSI VetMAX® PCR mix. The x-axis shows the cycles of the reaction (Ct). The dashed horizontal line shows the expected point at which the thermocycler would be able to discriminate the specific signal from background.

When regression lines for the plasmid and the resulting Ct were calculated for AgPath® and LSI VetMAX®, they were similar but with a lower Y-Intercept for AgPath® (Ct = -3.44 log GE + 40.15, and Ct = -3.47 logGE + 41.43 for AgPath® and LSI VetMAX®, respectively). However, when the OF samples were analyzed, the sensitivity was higher using the LSI VetMAX® (Figure 5).

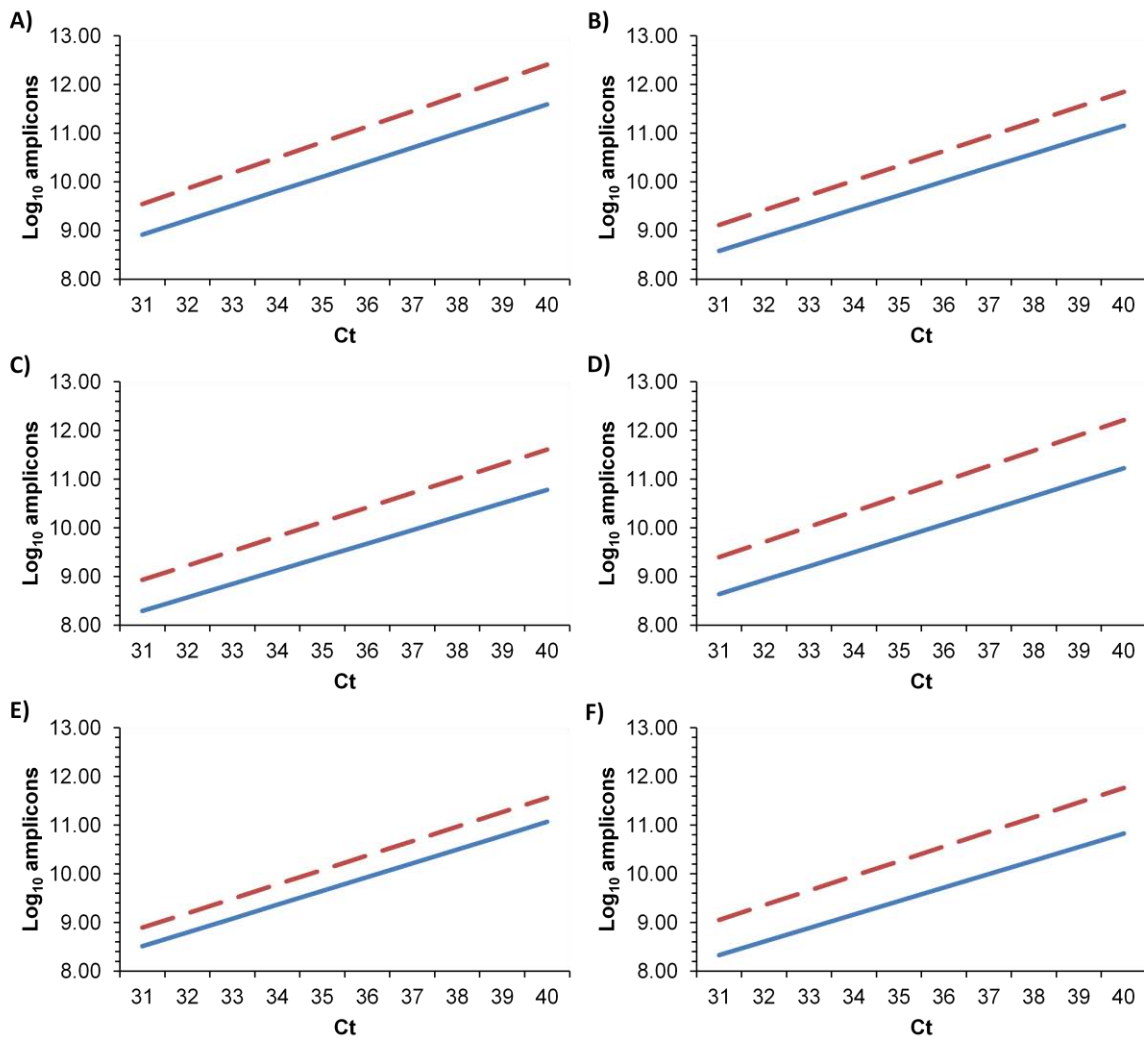


Figure 5. Theoretical number of amplicons resulting from 1 copy of PRRS virus RNA genome per tube as calculated from the efficiency of PCR reaction with A) TRIzol®, B) Nucleospin®, C) BioSprint®, D) MagMAX™, E) High Pure and F) PureLink® extraction kits for the AgPath® (orange dashed lines) and LSI VetMAX® (blue lines) mixes. The x-axis shows the expected Ct for a given number of amplicons (\log_{10}) produced in the PCR (y-axis).

4. Discussion

Use of OF for testing of pigs has gained popularity, particularly in North America, but is much less used in Europe. Accordingly, most of the available literature on this topic has been produced in North America, and has used PRRSV2. The knowledge on the optimization conditions of OF testing for PCR is very limited for PRRSV1 (Decorte *et al.*, 2013).

Looking at what has been published for PRRSV1 and PRRSV2, untreated cotton is the best matrix for collecting OF (Decorte *et al.*, 2015; Olsen *et al.*, 2013a), and collected samples should be kept refrigerated or frozen until analyzed (Decorte *et al.*, 2013; Prickett *et al.*, 2009). No agreement exists on whether or not centrifugation of OF is necessary or useful. In the present study, we developed a systematic approach to assess an optimized protocol of OF testing for PRRSV1.

It is worth noting that OF are usually collected as an aggregate sample of all –or almost all- pigs in a pen. That means, if early detection of the infection is desired in low-prevalence groups, the amounts of virus in the OF samples are expected to be low. Accordingly, efficient recovery of viral RNA is critical. To mimic this, we examined a dilution series that could account for most practical situations (with a minimum of 1 TCID₅₀/mL).

Besides this, RNA is easily degraded in biological fluids and therefore, pre-processing and storage conditions can be critical. In our hands, time and temperature are the most critical elements with a substantial loss of efficiency of detection of the virus after 72h at 4°C. This partially disagrees with Prickett *et al.* (2009), who reported similar results after refrigerating the OF at 4°C or 10°C for 12 days. In our opinion, this apparent discrepancy arises from the fact that Prickett spiked the samples starting at 10¹² RNA copies/mL. In previous experiments (Gibert *et al.*, unpublished), it was observed that shedding of PRRSV in OF was in the range of 10⁴ genomic equivalents at the peak of the infection, with a decrease later on.

In the present study it was observed that centrifugation of OF at speeds of up to 15,000 g for 15min resulted in increased sensitivity for the lowest virus concentrations. The reasons for this better performance are not clear to us. At the speeds used, it is expected

to remove big particles, such as feed remains, etc., but it is not enough to remove enzymes or other proteins. However, we noticed that after centrifuging at 15,000 g for 15min the fluidity of OF was enhanced, thus allowing an easier handling of the sample for the RNA extraction procedures. Other authors have divergent opinions on the usefulness of centrifugation (Kittawornrat *et al.*, 2014; Ramirez *et al.*, 2012), and some of them even recommend not to centrifuge at all (Olsen *et al.*, 2013a).

In general, it is thought that optimization of RNA extraction is crucial to keep a high sensitivity. Several kits are currently available on the market that are based on different principles: magnetic separation of nucleic acids and silica membranes; however, the original RNA extraction method of Chomczynski and Sacchi (1987) is better represented by the TRIzol® reagent extraction. In our hands, TRIzol® is the best extraction method resulting in almost optimal efficiencies in the qRT-PCR, followed by MagMAX™ and NucleoSpin®, more or less closely followed by the other kits. It is worth noting here that each kit uses different amounts of sample and elution volumes. In addition, the comparison is made more difficult by the fact that the assessment of RNA amount and purity is not possible for MagMAX™ or BioSprint®, since both kits extract all the nucleic acids contained in the sample (DNA plus RNA).

Taken globally, these results indicated that is not the methodology of extraction but the performance of a given kit what makes the difference. However, the practical performance of each RNA extraction kit could be similar in terms of detecting PRRSV in an OF sample collected in the field. As seen in Figures 3 and 4, even with the lowest virus concentration (1 TCID₅₀/mL, more or less equivalent to 10²-10³ genomic copies, as determined in previous experiments, not shown), the efficiency of the PCR would be enough to produce a signal that could be discriminated from noise at Ct<40.

Finally, we examined two commercial mixes (AgPath™ and LSI VetMAX®), in order to assess the importance of this factor. The LSI VetMAX® kit contains a set of primers, while AgPath™ is intended to be used with in-house designed primers. In this latter case, we used primers -that have been validated before- specifically designed for isolate 3267 to ensure that the performance of the PCR was not affected by mismatches. To assess the mere effect of the commercial mixes, a serial dilution of the 3267 ORF7-purified plasmid

was initially tested in both systems. The results showed similar regression lines, but with a slightly lower Y-intercept for AgPath™. However, when OF were tested, LSI VetMAX® performed better than AgPath™ in terms of the detection limit. There is no straightforward explanation for this change, but LSI VetMAX® is specifically sold to be used with serum and OF, while AgPath™ literally requires the “use of pure RNA that is free of RT-PCR inhibitors in the procedure”. It is tempting to think that AgPath™ was probably a little more affected by possible unspecific inhibitors during the RNA extraction.

5. Conclusions

The results of the present study may be helpful to design a standardized protocol for the PCR analysis of PRRSV 1 in OF. This protocol should take into account the collection of the sample in untreated cotton, as suggested before, with refrigeration of the sample for no more than 24h before analysis. Also, centrifugation at 15,000 g for 15min could improve the sensitivity. RNA extraction has to be checked in each laboratory, since the efficiency seems to be more dependent on the label than on the method.

6. Conflict of interest statement

No competing interests. The authors have received no funding from any company marketing RNA extraction kits or PCR kits. None of the contents of the present work have been examined, revised, or approved by any company or person having commercial interests in PRRSV diagnosis.

7. Acknowledgements

The present work was founded by the Spanish *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Agroalimentaria* (INIA), project RTA2011-00119-C0-00 and FEDER. Elisa Gibert Rebull was supported by a scholarship of INIA. PRRSV-free oral fluids were collected with the help of Cooperativa Ganadera de Caspe. The authors thank E. Cano for her technical support.

8. References

- Bierk, M.D., Dee, S. a., Rossow, K.D., Otake, S., Collins, J.E., Molitor, T.W., 2001. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can. J. Vet. Res.* 65, 261–266.
- Chittick, W.A., Stensland, W.R., Prickett, J.R., Strait, E.L., Harmon, K., Yoon, K.-J., Wang, C., Zimmerman, J.J., 2011. Comparison of RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine oral fluid specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23, 248–53.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–9.
- Darwich, L., Gimeno, M., Sibila, M., Diaz, I., de la Torre, E., Dotti, S., Kuzemtseva, L., Martín, M., Pujols, J., Mateu, E., 2011. Genetic and immunobiological diversities of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains. *Vet. Microbiol.* 150, 49–62.
- Decorte, I., Van Campe, W., Mostin, L., Cay, A.B., De Regge, N., 2015. Diagnosis of the Lelystad strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in individually housed pigs: comparison between serum and oral fluid samples for viral nucleic acid and antibody detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27, 47–54.
- Decorte, I., Van der Stede, Y., Nauwynck, H., De Regge, N., Cay, A.B., 2013. Effect of saliva stabilisers on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid by quantitative reverse transcriptase real-time PCR. *Vet. J.* 197, 224–8.
- Díaz, I., Gimeno, M., Darwich, L., Navarro, N., Kuzemtseva, L., López, S., Galindo, I., Segalés, J., Martín, M., Pujols, J., Mateu, E., 2012. Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Res.* 43, 30. doi:10.1186/1297-9716-43-30
- Gimeno, M., Darwich, L., Diaz, I., de la Torre, E., Pujols, J., Martín, M., Inumaru, S., Cano, E., Domingo, M., Montoya, M., Mateu, E., 2011. Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. Res.* 42, 9.
- Kittawornrat, A., Panyasing, Y., Goodell, C., Wang, C., Gauger, P., Harmon, K., Rauh, R., Desfresne, L., Levis, I., Zimmerman, J., 2014. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) surveillance using pre-weaning oral fluid samples detects circulation of wild-type PRRSV. *Vet. Microbiol.* 168, 331–9.
- Kittawornrat, A., Prickett, J., Chittick, W., Wang, C., Engle, M., Johnson, J., Patnayak, D., Schwartz, T., Whitney, D., Olsen, C., Schwartz, K., Zimmerman, J., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res.* 154, 170–6.
- Ochert, A.S., Boulter, A.W., Birnbaum, W., Johnson, N.W., Teo, C.G., 1994. Inhibitory effect of salivary fluids on PCR: potency and removal. *PCR Methods Appl.* 3, 365–8.
- Olsen, C., Karriker, L., Wang, C., Binjawadagi, B., Renukaradhya, G., Kittawornrat, A., Lizano, S., Coetzee, J., Main, R., Meiszberg, A., Panyasing, Y., Zimmerman, J., 2013a. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet. J.* 198, 158–63.
- Pileri, E., Gibert, E., Martín-Valls, G.E., Nofrarias, M., López-Soria, S., Martín, M., Díaz, I., Darwich, L., Mateu, E., 2017. Transmission of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1

- to and from vaccinated pigs in a one-to-one model. *Vet. Microbiol.* 201, 18–25.
- Pileri, E., Gibert, E., Soldevila, F., García-Saenz, A., Pujols, J., Diaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martín, M., Mateu, E., 2015. Vaccination with a genotype 1 modified live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus significantly reduces viremia, viral shedding and transmission of the virus in a quasi-natural experimental model. *Vet. Microbiol.* 175, 7–16.
- Prickett, J., 2009. Detection of viral pathogens of swine using oral fluid specimens. Grad. Theses Diss. Iowa State University.
- Prickett, J.R., Zimmerman, J.J., 2010. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim. Health Res. Rev.* 11, 207–16.
- Ramirez, A., Wang, C., Prickett, J.R., Pogranichniy, R., Yoon, K.-J., Main, R., Johnson, J.K., Rademacher, C., Hoogland, M., Hoffmann, P., Kurtz, A., Kurtz, E., Zimmerman, J., 2012. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev. Vet. Med.* 104, 292–300.
- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., Hoffman, L.J., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet. Microbiol.* 57, 69–81.

ESTUDI 3: Development of a model for evaluation of the use of oral fluids for monitoring of PRRSV in nurseries in quasi-stabilized herds.

1. Introduction

The use of oral fluids (OF) as a sample for the diagnosis and monitoring of swine diseases is gaining increasing popularity because of the easiness of the collection of samples but also because bleeding pigs is not necessary. In addition, pen-based collection of OF constitutes an aggregate sample that permits the examination of large groups of animals without the need of individual testing. However, these advantages might be counterbalanced by the fact that aggregate samples are a mixture of fluids obtained from different animals. Therefore, in situations where the prevalence of infected animals is low or very low -such as in quasi-stabilised herds- aggregation of individual samples may result in a dilution of the amount of analyte present. This could result in false negative results.

For PRRSV, monitoring of weaners is paramount to establish the epidemiological situation of the farm. According to Holtkamp *et al.* (2011), for *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) a stable farm is one where no virus circulation is detected at weaning age; that is between 7 days before and 3 days after weaning. The classification of a farm as stable requires a minimum of four consecutive negative PCR tests in weaning-age pigs sampled every 30 days or more frequently.

The use of OF in weaned pigs may contribute to simplify PRRSV testing of the farm while being respectful with the animal welfare (Prickett *et al.*, 2008b; Ramirez *et al.*, 2012). One of the main aspects which could influence in the detection of PRRSV weaners could be the proportions of infected pens or shedding pigs. Olsen *et al.* (2013b) estimated a probability <50% for detecting PRRSV in pen-based OF when the pen prevalence was $\leq 10\%$. Nevertheless, the limits of this approach for monitoring low prevalence herds have not been defined yet.

The objective of the present study was to develop a probability calculation model to explore the limitations of the use of OF for the monitoring PRRSV1 in nurseries coming from quasi-stabilized sow herds.

2. Materials and methods

2.1 Herd structure

The probability calculation was designed to be applied to farrow-to-wean herds where the number of productive sows is stable over time. It was assumed that the farm worked with a conventional flow (replacements-service areas-gestation-maternities) and operated with weekly farrowing batches. The sow population is distributed in the maternity crates randomly (Figure 1). Piglets are distributed in pens of the nursery either at random (scenario 1) or considering that nursery pens receive animals from the same maternities (scenario 2).

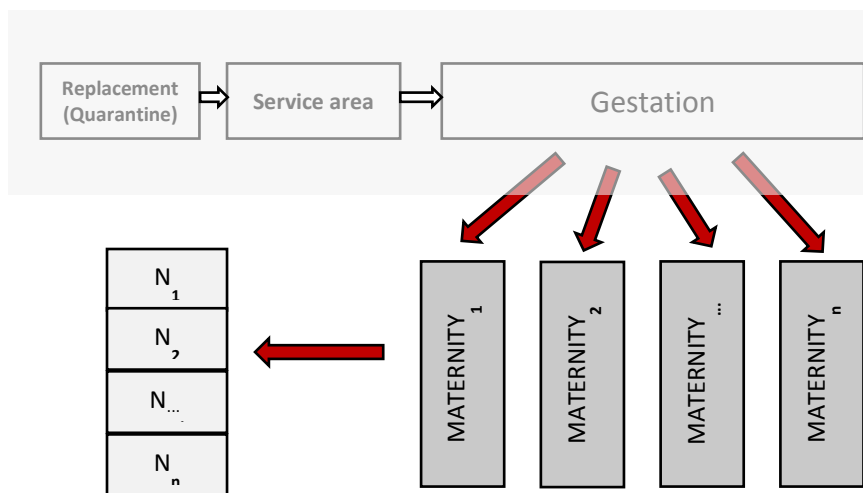


Figure 1. The flow of production. The calculation starts with the distribution of sows in the maternities. The distribution of sows is based on a standard proportion of parities being the risk of having a vertical transmission event slightly different per parity. If vertical transmission happens within a maternity then transmission increases the proportion of infected piglets in maternities over time. Weaners are distributed in nurseries either at random (scenario 1) or according to the maternities of origin (scenario 2).

The initial assumptions for the calculations are the following:

- a) Sows are uniformly (random) distributed in the maternities but the distribution follows the parity proportions.

- b) The probability of a vertical transmission event is equal in all maternities but a second vertical transmission event do not happen until all maternities suffered at least one.
- c) The farm vaccinates against PRRSV. Immunity by repeated recall vaccinations make less likely a vertical transmission event in older sows compared to the younger ones. Thus, the probability of a sow having a vertical transmission event depends on the parity. It is assumed that parity 1 and 2 have a higher probability (2X) compared to parities 3, 4 and 5 and the latter have more probability (2X) than older sows.
- d) Within a maternity where a vertical transmission event occurred, the transmission will be higher among piglets in the same pen than to piglets in a contiguous pen.
- e) Transmission between different litters in the same maternity may occur by direct contact in contiguous maternities or by indirect means. For practicality, both elements have been considered together.
- f) In maternities sows are confined. In maternities, transmission between sows and piglets of different litters was considered to be negligible.
- g) No transmission occurs between different maternities.
- h) Piglets are weaned at four weeks of age.
- i) Nursery pigs are tested only once, at entering nursery pens.

2.2 Variables and parameters

The initial variables and parameters are shown in Table 1. In principle, variables that could be modified by the user were: number of sows; number of farrowings/sow/year; number of farrowing crates/maternity, incidence of vertical transmission events (births with viremic piglets); proportion of piglets born viremic if the vertical transmission event occurred; mortality for infected piglets; capacity of a nursery pen; number of sampled pens. Values that could not be changed by the user but were included in the calculations were: analytical and diagnostic sensitivities of the PCR using OF; R values for the transmission, distribution of sows per parities; relative probability of having a viremic litter per parity, mortality in healthy piglets and live born piglets/litter.

Table 1. Variables and parameters used in the calculations of the probability model.

Variables	Range of admitted values	Type of distribution used
a) N° productive sows	Any	N.A.
b) Farrowing/sow/year <i>Farrowing sows/week (FSW) = [(a*b)/52]±5%</i>	2.2-2.4	N.A. <i>(FSW) PERT (mode: [(a*b)/52]; minimum: [(a*b)/52]-5%; maximum: [(a*b)/52]+5%)</i>
c) N° of farrowing crates/maternity <i>N° of maternities=Round upper FSW/c</i>	14-20	N.A.
d) Incidence of vertical transmission (n° of events)	1-10% of the total farrows±10% of the average	Random with 10% variation over the average
e) Proportion of piglets born viremic if the vertical transmission event occurred	33-75%	Random (Aleatorio.entre) <i>(Cano et al., 2009; Kranker et al., 1998; Mengeling et al., 1994; Rowland et al., 2003)</i>
f) Mortalities for infected piglets in maternity	10-25% per week (Scortti et al., 2007)	N.A.
g) Capacity of a nursery pen	10-50	N.A.
h) N° of pens examined	5-10-14-19-29-59	N.A.
i) R for piglet-piglet transmission between contiguous litters in the maternity	0.7-1.4	Random
Parameters		
j) Analytic sensitivity of PCR	1x10 ² genomic copies/mL of OF	N.A.
k) Diagnostic sensitivity if virus is present above analytical threshold	100%	Random (Aleatorio.entre)
l) R for transmission to piglets in the same littermate	2.8 (Pileri et al., 2015)	
m) R for piglet-piglet transmission between contiguous litters in the maternity	0.7-1.4	Random
n) Distribution of sows by parity	P1: 1 st +2 nd parity: 43%±5% over average P2: 3 rd +4 th +5 th parities: 42%±5% over average P3: ≥6 th parity: 15%±5% over average	Random
o) Probability of having a viremic litter	P3<P2<P1 P3: 0.146 P2: 0.283 P1: 0.571	N.A.
p) Mortality rate for uninfected suckers	11%±5% in the whole lactation period	N.A.
q) Live born/sow/litter	12.93±5% (BDPorc 2014)	Random

2.3 Model building

2.2.1 Distribution of vertical events in the maternities

The first step in the calculations was to simulate a one-year cycle of the farm and the distribution of farrows per maternity. A PERT distribution probability table was used for that, considering the mode of the distribution as the result of multiplying the number of productive sows by the expected number of parturitions/sow/year and dividing the resulting number by 52 weeks. The maximum was set to the mode plus 5% and the minimum was the mode less 5%. With this calculation, a range of potential values was obtained between the minimum and the maximum; each one with an associated PERT probability. Then, the potential farrows per week were ordered and the accumulated probabilities were calculated. A random number determined what number of farrows was to happen in a week. For example, in a 1,000-sow farm, the mode was set to 44 and the maximum and minimum was set at 5% (± 2.2 ; 3 if rounding). The series of potential farrows was 41, 42, 43, 44, 45, 46, and 47. According to the PERT distribution, to have 41 or less farrows in a given week had an associated probability of 0.0294; to have 42 farrows have an associated probability of 0.08613; having 43 farrows had an associated probability of 0.190908 and so on. The accumulated probabilities were thus: 0.0294; 0.11553; 0.306438. If the random number was 0.24, it was assigned 43 farrows to that week; if 0.01; 42 farrows would be assigned.

Once the number of farrows in a given week was assigned, the distribution of sows per parity was calculated according to the standard distribution set for this model (see Table 1). The maternities were randomly filled with the number of sows resulting of the previous calculation. This permitted to determine later how many piglets will exit each maternity towards the nurseries.

The number of vertical transmission events for a given week resulted from a random value within the assigned incidence range. The distribution of vertical transmission was divided by the number of available maternities. If the number of maternities was lower than that of viremic events, no maternity was allowed to have a second vertical transmission until all have at least one. Similarly, for the second and subsequent events.

2.2.2 Transmission of PRRSV in the maternities

The initial number of viremic piglets was according to a random distribution from 33 and 75% (Cano *et al.*, 2009; Kranker *et al.*, 1998; Mengeling *et al.*, 1994; Rowland *et al.*, 2003). After that, the intra-crate transmission was simulated by applying a $R=2.8$ (Pileri *et al.*, 2015) to the number of infected animals at the end of each week discounting the mortality rate for infected animals that was set between 10-25% per week (Scotti *et al.*, 2007). It was assumed that transmission to contiguous pens occurred infecting first one piglet. The R for transmission between maternities was randomly assigned for each case within the range 0.7-1.4. Afterwards, the infection spread within the newly infected pen with an R of 2.8.

2.2.3 Number and classification of weaned piglets

The number of live born piglets was defined as the average for Catalanian farms $\pm 5\%$ random variation (BDPorc, 2014)¹². In uninfected pens, the number of weaned pigs resulted from subtracting to the whole number of live born piglets the "regular" mortality rate. In infected pens, the calculation was similar but the mortality was calculated considering the differences between healthy and infected piglets.

2.2.4 Distribution in the nurseries

- Scenario 1: Random distribution of piglets in nurseries. In this case, it was assumed that all animals have the same probability to be distributed in any pen. Accordingly the global prevalence of viremic piglets at wean was similar for all pens.

-Scenario 2: In this case, pens could contain either animals coming from infected maternities or from uninfected maternities. Similarly, if all maternities had vertical transmission events, some pens could receive animals from maternities where two or eventually more events happened.

2.2.5 Probability calculations

Different scenarios were examined: 500, 1000, 2000 and 4000-sow farms; 14, 16, 18 or 20 farrowing crates per maternity and four scenarios for the vertical transmission: 2%,

¹² <http://www.bdporc.irta.es/informes/PartPublica/Datos%20publicos%20Anyo%202015.htm>

5%, 8% and 10%. In the nurseries, animals could be allocated in pens with capacities for 10, 20, 30, 40 or 50 animals.

Firstly it was calculated the probability of having only PRRSV-negative animals in a pen. Then, it was calculated the probability of having only one PRRSV-positive animal in a pen (worst case). Finally, it was calculated the probability of selecting only negative pens for testing.

3. Results

As shown in Figure 2A, B and C, in the randomly mixing model for nurseries, at low incidence rates for vertical transmission (2%) the probability that all animals in a nursery were negative exceeds 30% in all the examined scenarios for pens of 25 pigs or less.

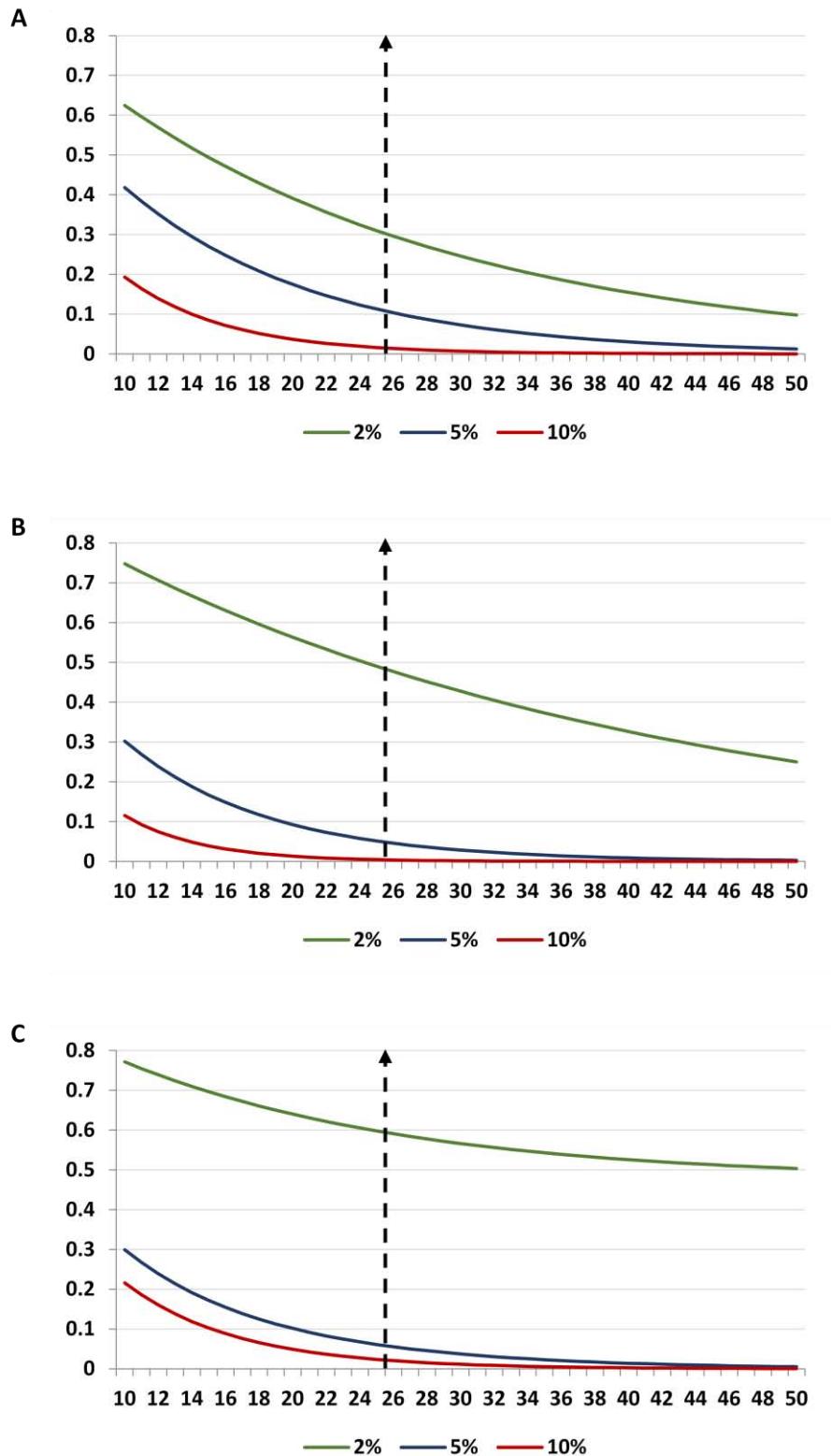


Figure 2. Probability that n weaners within a given pen were all uninfected (PRRSV negative) if piglets are mixed randomly in the nurseries. Number of animals/pen are shown in the X-axis and probabilities are shown in the Y-axis. The figure depicts three different scenarios: 2%, 5% and 10% of births with vertical transmission. A=farm of 4,000 sows where maternities have capacity for 20 sows; B=2,000 sows, 16 sows/maternity; C=500 sows; 14 sows/maternity.

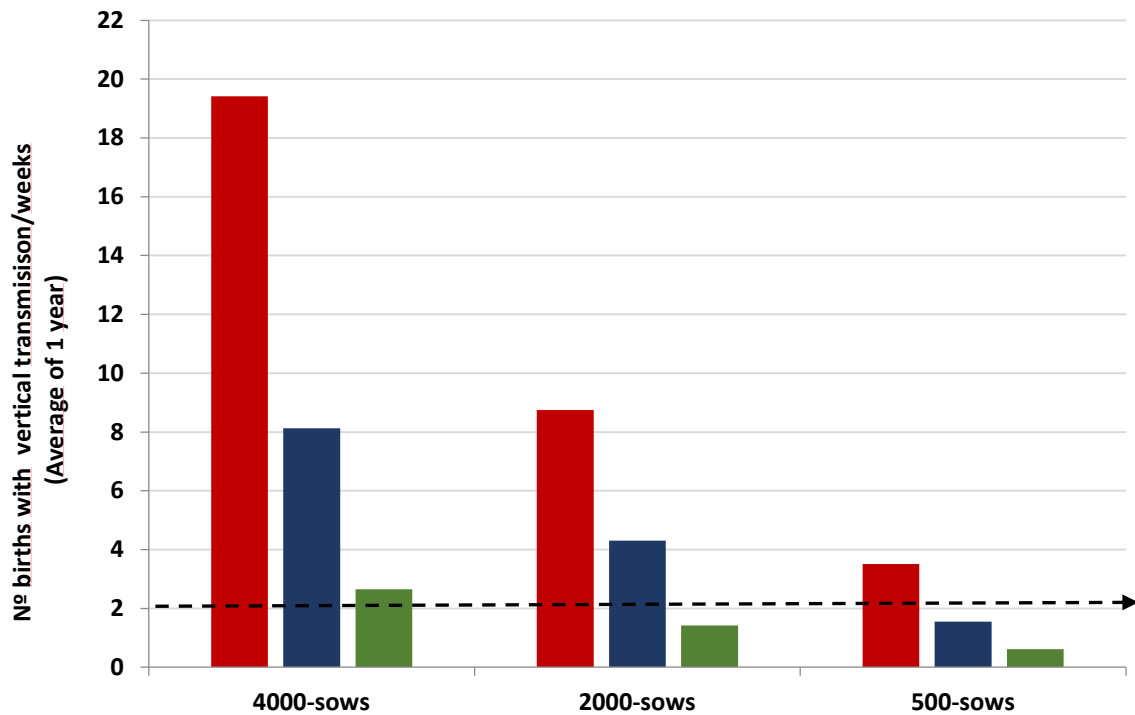


Figure 3. Average number of vertical transmission events (1-year simulation) in three different farms: 4,000; 2,000 and 500-sows. The graph depicts three different scenarios per farm: 2% (green), 5% (blue) and 10% (red) of vertical transmission events per farrowing/batch.

As shown in the Figure 3, the number of viremic births is reduced with a low incidence of vertical events. This effect is amplified when the size of farrowing herd is small. In this case, the probability of hang a rope in a negative nursery pen is very high.

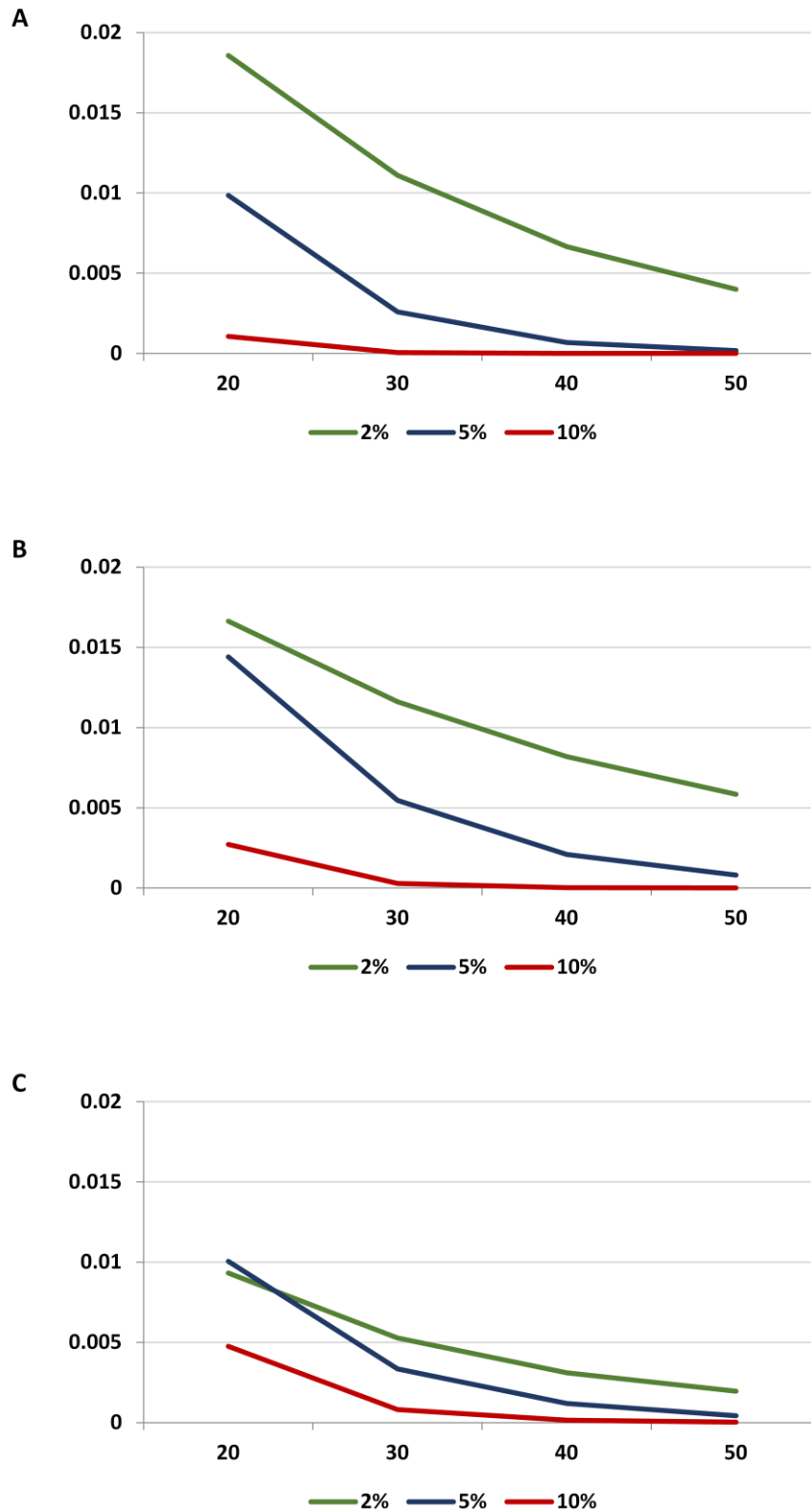


Figure 4. Probability of a nursery allocates a single infected animal when piglets are mixed randomly in the nurseries. Numbers of animals/pen are shown in the X-axis and probabilities are shown in the Y-axis. The figure depicts three different scenarios: 2%, 5% and 10% of births with vertical transmission. A= farm of 4,000 sows where maternities have capacity for 20 sows; B=2,000 sows, 16 sows/maternity; C=500 sows; 14 sows/maternity.

In all scenarios, pens with single shedders had a probability to occur of less than 2%; falling under 0.5% with a vertical transmission event ration of 10%.

When animals are distributed in the nurseries according to the maternity of origin, again the vertical transmission rate is the key element conditioning the proportion of pens allocating at least one infected animal (Figure 5). Thus, with vertical transmission rates equal to 2%, the proportion of pens with infected animals will not exceed 22% in 2000 and 500-sows scenarios. Accordingly, the number of pens to be tested should be enough to detect this proportion.

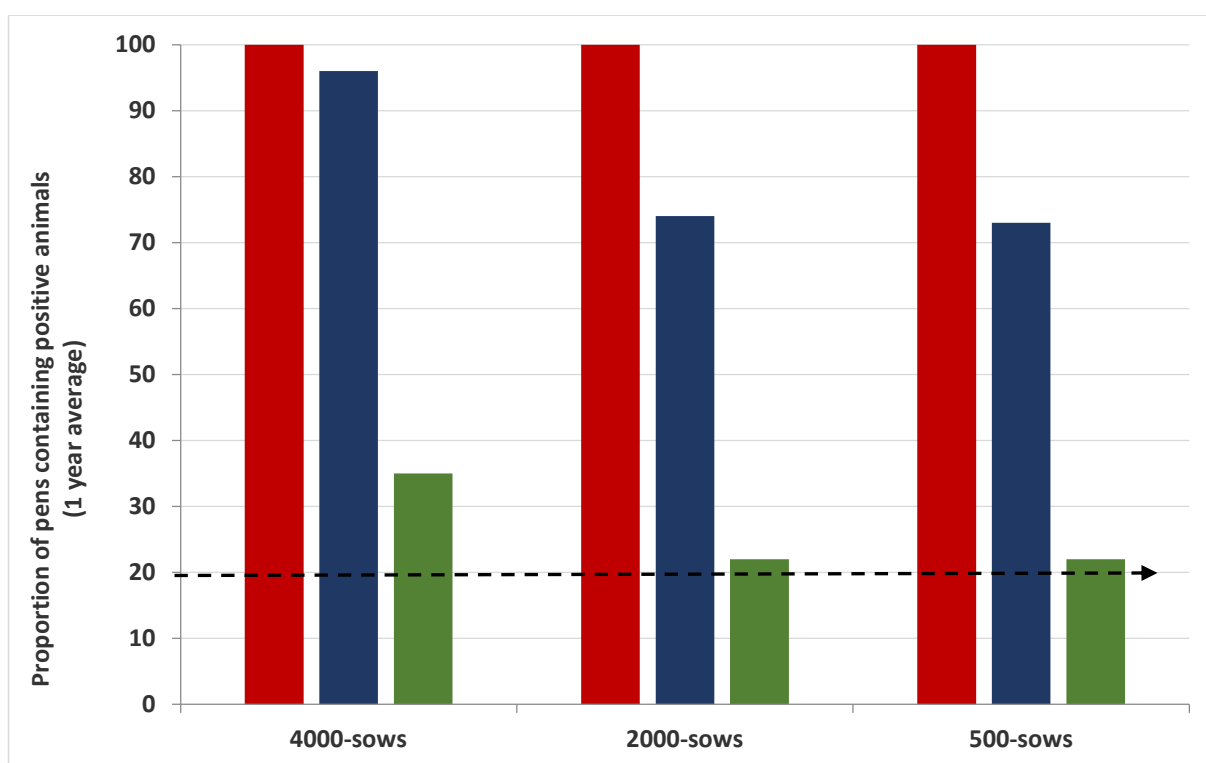


Figure 5. Average proportion of pens containing at least one infected animal if animals are distributed in the nurseries according to the maternity of origin. The graph depicts three different scenarios per farm: 2% (green), 5% (blue) and 10% (red) of vertical transmission events per farrowing/batch in farms with 500, 2,000 and 4,000 sows (14, 16 and 20 crates per maternity, respectively).

4. Discussion

The use of OF is a very interesting sampling method for monitoring pig populations across time. However, since it is an aggregate sample its efficacy can be expected to depend on the proportion of positive animals within the pen and the proportion of positive pens within the batch (Ramirez *et al.*, 2012). In turn, that proportion depends on the previous events of transmission within the farm and, in the case of nurseries; this corresponds to the events of vertical transmission. So, in situations where the percentage of viremic litters at birth is low, the use of OF could jeopardize the monitoring.

According to our results, the main factor influencing the detection of PRRSV hanging a rope in the nursery pens was the incidence of vertical events. In scenarios with 10% for the vertical transmission events, the probability of having only PRRSV-negative animals in a given pen was <22%.

In scenarios below 10% of vertical incidence, also depends on the size of nursery pens and the size of the reproductive herd. Less number of pigs in the nursery pens leads to more probability of sampling only negative pens (12-42% in pens with ten animals and 5-10% of vertical incidence). In contrast, if we considered a standard size of nursery pens (20-30 pigs/pen), in scenarios with vertical incidences >2% this probability was below 11%. In contrast, in scenarios where the incidence was 2%, the probabilities were 30%, 50% and 60% for 4,000, 2,000 and 500-sows, respectively.

The number of viremic births per week is reduced to 3-1 in one year (Figure 3). Thus in 500-sows farms with the 2% vertical transmission events scenario, most of the weeks there were no vertical events and, as a result, the virus was not present in the weaning units.

Also, it was calculated the probability of having only one infected animal per pen in that same scenarios (the worst-case scenario), resulting <2%, thus a relatively infrequent event. In addition, considering the minimum viral load of 10^2 genomic copies/mL of individual OF determined in the first study of the present thesis, we calculated the resulting viral load of the aggregate sample in a 50-animals pen (all animals were assigned the same probability of chewing the collection rope). The result was 2 genomic

copies/mL, that would be still in the range of the detection limit (1 genomic copy/mL), as determined in the second study of the present thesis.

When nurseries are filled according to the maternity of origin, it has to be considered that sampling of pens should at least accomplish detection of an infected pen for 20% prevalence of infected pens. With a 95% confidence, this means that in most instances 12-14 pens should be examined. If a 500-sows farm produced about 13 piglets per sow; operating on a weekly basis that means that every week weans about 290 piglets. If nursery pens have a capacity of 20, there will be 15 pens of which 10 should be examined. In other words, in small farms it would be necessary to examine most of the pens if not all.

In conclusion, the main factors affecting the potential for detection of infected pens were the proportion of vertical transmission events, the size of reproductive herd and the nursery pens, and the number of pens examined. In situations below 2% of vertical events for farms of less than 2,000 sows, most weeks there were no births of viremic animals and, accordingly, detection of the virus was impossible. For these cases, other suitable methods, like targeted sampling to weak-born animals, poor-health weaning piglets, or for example, obtaining of umbilical cords from animals born from a problematic parturition, would be additional methods to potentially increase sensitivity. Moreover, the probability of having pens with only one infected animal was below 2% and even in such scenario, the RT-PCR could be able to detect the virus in most shedding (viral load) scenarios. However, future research should be based on the practical application of this model and in the study of individual behaviour, which could play an important role in the infected-animals rope contribution taking into account hierarchies, health, etc.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to J. Casals and V. Ciaravino for their excellent contribution to the model building.

6. References

- Cano, J.P., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Rovira, A., Morrison, R.B., 2009. Infection dynamics and clinical manifestations following experimental inoculation of gilts at 90 days of gestation with a low dose of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 73, 303–7.
- Holtkamp, D.J., Polson, D.D., Torremorell, M., Morrison, B., Classen, D.M., Becton, L., Henry, S., Rodibaugh, M.T., Rowland, R.R., Snelson, H., Straw, B., Yeske, P., Zimmerman, J., 2011. [Terminology for classifying the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) status of swine herds]. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere. Nutztiere.* 39, 101–12.
- Kranker, S., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., Bøtner, A., 1998. Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 61, 21–31.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., 1994. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1391–8.
- Olsen, C., Wang, C., Christopher-Hennings, J., Doolittle, K., Harmon, K.M., Abate, S., Kittawornrat, A., Lizano, S., Main, R., Nelson, E.A., Otterson, T., Panyasing, Y., Rademacher, C., Rauh, R., Shah, R., Zimmerman, J., 2013b. Probability of detecting Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection using pen-based swine oral fluid specimens as a function of within-pen prevalence. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 328–35.
- Pileri, E., Gibert, E., Soldevila, F., García-Saenz, A., Pujols, J., Diaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martín, M., Mateu, E., 2015. Vaccination with a genotype 1 modified live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus significantly reduces viremia, viral shedding and transmission of the virus in a quasi-natural experimental model. *Vet. Microbiol.* 175, 7–16.
- Prickett, J.R., Kim, W., Simer, R., Yoon, K.-J., Zimmerman, J., 2008b. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Heal. Prod* 16, 86–91.
- Ramirez, A., Wang, C., Prickett, J.R., Pogranichniy, R., Yoon, K.-J., Main, R., Johnson, J.K., Rademacher, C., Hoogland, M., Hoffmann, P., Kurtz, A., Kurtz, E., Zimmerman, J., 2012. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev. Vet. Med.* 104, 292–300.
- Rowland, R.R., Lawson, S., Rossow, K., Benfield, D.A., 2003. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet. Microbiol.* 96, 219–235.
- Scortti, M., Prieto, C., Alvarez, E., Simarro, I., Castro, J.M., 2007. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet. Rec.* 161, 809–13.

PART III:

Discussió general i conclusions

DISCUSSIÓ GENERAL

La síndrome reproductiva i respiratòria porcina (PRRS) és una de les malalties endèmiques que genera més pèrdues econòmiques en la indústria porcina (Holtkamp *et al.*, 2013). Per aquesta raó, en moltes regions s'intenten aplicar plans de control i eradicació de la malaltia. En aquest sentit, el monitoratge del virus en les diferents subpoblacions de la granja esdevé una peça fonamental per al bon resultat d'aquests plans, especialment respecte la detecció de la circulació del virus des de les maternitats cap a les transicions. Així, la identificació de garrins virèmics a la sortida de les maternitats és clau per avaluar l'eficàcia de les mesures de control establertes i encaminar una granja endèmica de PRRS cap a la possible eradicació de la malaltia (Cano *et al.*, 2009). Habitualment, es considera que una granja s'ha estabilitzat pel que fa a la circulació del PRRSV quan no hi ha animals virèmics. Generalment això es verifica sagnant els garrins a la sortida de les maternitats (Holtkamp *et al.*, 2011). No obstant, la presa de sang requereix un maneig elevat dels animals i genera estrès.

Des de fa alguns anys, s'està estudiant l'ús dels fluids orals (FO) com a matriu diagnòstica en la detecció del PRRSV i la seva possible aplicació en programes de control i eradicació (Kittawornrat *et al.*, 2010; Prickett *et al.*, 2008a; Prickett *et al.*, 2008b; Ramirez *et al.*, 2012). La recollida de FO és una metodologia senzilla -a l'abast de qualsevol- ràpida, poc costosa econòmicament i respectuosa amb el benestar dels animals. Tanmateix, encara resten algunes incògnites sobre el potencial dels FO, tan per a substituir les anàlisis a partir del sèrum de garrins a la sortida de les maternitats, com per la vigilància en les transicions.

Els FO són àmpliament utilitzats als Estats Units pel monitoratge del virus en transicions, i la gran part dels estudis realitzats sobre el seu ús s'han dut a terme a Nord Amèrica, utilitzant-se en la majoria de casos el PRRSV2. En canvi a Europa, la recerca per la detecció del PRRSV1 i l'aplicació al camp d'aquesta metodologia està sent més discreta (Decorte *et al.*, 2015). Cal tenir en compte a més, que hi pot haver diferències gens menyspreables (Martínez-Lobo *et al.*, 2011) a nivell de detecció

entre les recentment definides per l'ICTV¹³ com a dues espècies diferents, el PRRSV1 i el PRRSV2.

En el primer estudi presentat en aquesta tesi es defineix el rang de la càrrega vírica excretada en FO per a la soca 3267 del PRRSV1 en $10^2 - 10^4$ còpies genòmiques/mL, situat dins dels límits de detecció de la qRT-PCR utilitzada. Durant la fase de virèmia la concentració de virus és igual o superior en sèrum que en FO, tot i que el virus en sèrum pot desaparèixer abans que en els FO. Com ja es va demostrar en estudis anteriors, alguns animals segueixen excretant virus malgrat no estar virèmics (Decorte *et al.*, 2015; Gerber *et al.*, 2013; Kittawornrat *et al.*, 2010). En els animals vacunats aquest perfil no és tan clar ja que es modifica el patró de virèmia i excreció a la baixa. Aquests resultats ens indicarien que els FO probablement contenen virus suficient com per a ser potencialment infectius més enllà de la fase de virèmia, almenys per via percutània (Hermann *et al.*, 2005). En aquest sentit, seria interessant plantejar un estudi per conèixer l'abast d'aquesta excreció postvirèmica (durada, constància i càrrega viral). Si a més es plantegés un experiment semblant al de Bierk *et al.* (2001) però complementant-lo amb el monitoratge dels FO, es podria arribar a saber si realment són un vehicle de transmissió de la malaltia en situacions endèmiques. Si així fos, els FO representarien l'única manera incruenta per conèixer el potencial de transmissió d'un animal durant la fase postvirèmica.

La detecció, a partir del dia 2 PI, del 90% dels animals inoculats com a excretors, confirmaria l'equivalència del sèrum i els FO en la detecció precoç del virus, ja plantejada en l'estudi de Kittawornrat *et al.* (2010). Segons aquests autors, a dia 2 PI ja es detecta excreció en els FO tot i que no mostren la proporció d'excretors fins a dia 7 PI. En canvi, els nostres resultats són diferents als de l'estudi de Decorte *et al.* (2015) en què es detecta abans el PRRSV1 en el sèrum, a 3 dies PI, que en els FO, on no el detecten fins el dia 7 PI. Per una altra banda, en l'estudi de Gerber *et al.* (2013), on es comparen diferents matrius per la detecció del PRRSV, tot i detectar el virus a partir del dia 1 PI en FO, és el tipus de mostra on les taxes de detecció són més baixes: durant els primers 21 dies $\leq 70\%$ de verros inoculats són positius en FO.

¹³ Font: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> darrera consulta el 9/11/2016.

D'una banda el fet d'avaluar diferents soques pertanyents fins i tot a diferents espècies (PRRSV1 i 2) i de l'altra, les possibles diferències en les eficiències de les PCR emprades, podrien tenir importància respecte les divergències observades entre estudis.

En l'article de Decorte *et al.* (2015) també sorprèn la quantitat de FO no analitzats, pensem que per manca de mostra. Una explicació podria ser l'edat dels animals i el fet d'estar allotjats individualment. Mentre que en els estudis de Kittawornrat *et al.* (2010) i Gerber *et al.* (2013) es mostregen verros adults distribuïts en gàbies individuals, en el cas de Decorte *et al.* (2015) utilitzen garrins de 8 setmanes d'edat. Nosaltres també vam utilitzar garrins allotjats en parelles i alguns individualment. En aquest sentit, caldria considerar que l'entrenament dels animals per deixar els seus FO en la matriu de recol·lecció no és un tema menor en aquest tipus de mostra (White *et al.*, 2014). De fet, en un estudi preliminar a aquesta tesi, vam posar en pràctica la recol·lecció de FO individuals en garrins mitjançant la immobilització de l'animal i la introducció d'un Salivette® per la boca. Aquesta estratègia va fracassar parcialment ja que es recuperaven quantitats exigües de mostra. La màxima sensibilitat de detecció del virus en FO per qRT-PCR va ser del 36.4% (8/22 animals) a dia 2 PI, mentre que en sèrum era del 100% (Gibert *et al.*, 2014). A més, calien com a mínim dos operaris per dur-la a terme i era molt estressant pels animals. Pensem que l'estrès relacionat amb la subjecció va ser el causant de la manca de secreció salival. Al nostre entendre, una de les aportacions d'aquest primer estudi és el desenvolupament d'una metodologia per a l'optimització de l'obtenció de FO a nivell individual.

Basant-nos en els nostres resultats, podríem afirmar que els FO serien una eina vàlida pel monitoratge de transicions. El problema però es podria plantejar en l'avaluació per FO d'animals de reposició provinents de transicions infectades i/o vacunades. En el cas dels animals vacunats hem vist que, a la llarga, l'excreció es converteix en erràtica. Per tant, si en un mostreig de FO no es detecta el PRRSV, no es pot descartar que en algun moment no s'excreti. En el cas d'animals infectats fa temps que mantenen el virus en el teixit limfoide i són capaços de transmetre'l

(Bierk *et al.*, 2001; Rowland *et al.*, 2003; Wills *et al.*, 2003), pot ser que encara excretin però amb una càrrega viral tan baixa que no siguem capaços de detectar el virus en mostres de FO col·lectius.

En la validació d'una matriu diagnòstica nova com els FO, l'objectiu és comprovar que els resultats reflecteixen amb la major fiabilitat possible el que passa en l'animal. Per això cal tenir en compte que durant tot el procés, des de la recollida de la mostra a l'obtenció dels resultats, existeix un seguit de factors que poden provocar pèrdues d'eficiència i per tant, una disminució en la sensibilitat de la tècnica. Aquesta pèrdua de sensibilitat pot no ser rellevant en granges no estabilitzades, però en una granja amb baixes prevalences, estable o en vies d'eradicació, podria ser determinant. Per pal·liar-ho cal identificar aquests factors, analitzar-los i intentar optimitzar-los. En el cas dels FO podrien ser la presència i quantitat del patògen, el tipus de mostreig, l'estabilitat de l'RNA o els mètodes d'extracció i anàlisi.

En el segon estudi de la present tesi s'ha abordat la detecció del virus: en la matriu de recol·lecció, segons el temps i temperatura, el tipus de conservació i el tractament de la mostra (centrifugació); a més de l'extracció i l'anàlisi per qRT-PCR. Per completar tot el procés plantejat però, ens mancava un estudi de caire comportamental sobre el mostreig col·lectiu de FO, és a dir, si en corrals de transició (d'uns 20-25 animals) amb baixes prevalences hi podria haver un efecte de dilució de la mostra, o si l'aportació de FO dels animals infectats i malalts seria la mateixa que la resta. De fet, aquest estudi el vam dissenyar però no el vam poder dur a terme per manca de temps i finançament.

Respecte les matrius de recol·lecció, en estudis anteriors s'havia demostrat que l'ús del cotó no tractat proporcionava una millor detecció del virus per qRT-PCR que altres materials com el cànem, el niló o el polièster (Decorte *et al.*, 2015; Olsen *et al.*, 2013a). A partir d'aquest coneixement previ i de la nostra experiència amb l'estudi preliminar, vam enfocar la part d'avaluació de les matrius cap a la influència de les diferents presentacions del cotó no tractat en la capacitat de retenció de líquid i interferència en les anàlisis. D'acord amb els nostres resultats, la manera

com es presentés el cotó no tractat no variava les seves propietats, per tant, es podria aplicar la presentació que més convingués: corda en grups, Salivette® en recollida individual, etc.

Pel que fa al tipus de conservació, temps i temperatura, segons els resultats obtinguts la congelació de la mostra no alteraria la detecció de l'RNA víric. En el pas següent vam voler establir el límit de temps per a la conservació dels FO a 4 °C, simulant que les mostres es deixaven d'un dia per l'altre, o bé que es rebien un divendres i no s'analitzaven fins el dilluns següent. En aquest experiment la sensibilitat analítica disminuïa a les 72h, molt abans que en l'estudi de Prickett, 2009, on la sensibilitat es mantenia més o menys constant a 4°C fins 12 dies. Pensem que l'explicació a aquesta divergència caldria buscar-la en la concentració de l'inòcul víric, mentre que Prickett, 2009 van infectar els FO amb 10^{12} còpies d'RNA/mL, nosaltres ho vam fer amb concentracions de virus properes a les detectades en l'excreció d'animals infectats per contacte, 10^0 - 10^4 TCID₅₀/mL. Per tant, a concentracions tan baixes de virus, la degradació es fa palesa molt abans. Tanmateix, Decorte *et al.*, 2013 van infectar FO amb concentracions de virus de $10^{3.5}$ i $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL, situades dins del nostre rang, i els resultats també van ser diferents. En ambdós casos es va observar una lleugera disminució del nombre de còpies genòmiques a partir de les 72 h, malgrat això, van ser capaços de detectar el virus durant 7 dies a 4°C fins i tot amb la concentració de $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL. Una possible explicació seria que la seva equivalència entre TCID₅₀/mL i còpies genòmiques fos diferent a la nostra, bé per la soca o bé per la forma de contar-ho.

De totes maneres, segons la nostra experiència les recomanacions serien posar en fred els FO immediatament després de la seva recol·lecció, mantenir-los així durant el transport i, un cop al laboratori, desar les mostres com a màxim 24h a 4°C o, alternativament, congelar-les. L'ús de -20°C o -80°C no l'hem comparat.

Pel que fa al tractament de la mostra abans de l'extracció aquesta és una qüestió no prou aclarida. En molts estudis previs els FO es centrifuguen (Kittawornrat *et al.*, 2010; Ramirez *et al.*, 2012). Tanmateix Olsen *et al.*, (2013) van mostrar que centrifugar era contraproductiu per a la detecció d'anticossos. En canvi, no van

analitzar per qRT-PCR els FO centrifugats, creiem que per falta de mostra, per tant per la detecció de l'RNA no ho van arribar a demostrar.

En aquest punt del nostre treball l'objectiu principal era veure si la centrifugació produïa una pèrdua de sensibilitat, potser per l'adhesió del virus a partícules més grans que podrien sedimentar. Segons els nostres resultats, després de centrifugar no només no vam perdre quantitat de virus sinó que en vam augmentar la sensibilitat. De fet, va succeir una cosa ben curiosa: les mostres desades 24h a 4°C, tan si es centrifugaven com si no, van mostrar una major sensibilitat que quan van ser analitzades en fresc. Una possible explicació seria que durant aquest temps les partícules més grolleres haurien sedimentat i hauria millorat la detecció (Romagosa *et al.*, 2012).

L'explicació a la millor detecció de l'RNA víric en les mostres centrifugades creiem que l'hauríem de basar en un mer aspecte físic, causat per la força a què es sotmet la mostra durant aquest procés. En primer lloc, en precipitar les partícules més grans augmenta la fluïdesa dels FO i per tant, millora el seu maneig i precisió en el pipeteig, i disminueix la probabilitat de pèrdua de mostra durant l'anàlisi. Per una altra banda, en quedar-nos només amb el sobrenedant, a volums iguals, el volum que abans estava ocupat per les partícules sedimentades ara l'ompliria més part líquida, que seria la que contindria les partícules víriques. Comparativament, la repercussió d'aquests fenòmens serà major quan menor sigui la concentració de la mostra. Una darrera hipòtesi, al nostre entendre menys plausible, seria que les partícules sedimentades, principalment orgàniques (femta, palla, pinso, etc.), podrien contenir potencials inhibidors que serien eliminats de la mostra. Això no afectaria però els inhibidors solubles.

Per tant, a fi i efecte d'augmentar la sensibilitat per poder obtenir resultats positius en aquelles mostres que tenen menor concentració vírica, la nostra recomanació seria centrifugar els FO abans d'analitzar-los. No seria tan important la velocitat i el temps establerts com la clarificació i augment de fluïdesa dels mateixos, sobretot si es tracta de mostres molt contaminades.

Arribats en aquest punt del procés, es pot pensar que l'extracció de l'RNA és el pas clau, ja que la puresa de l'RNA extret, o altrament dit, la quantitat de potencials inhibidors de la qRT-PCR presents en l'eluït, ens determinaria l'eficiència de la reacció, i per tant, la sensibilitat.

En aquest sentit, existeixen dos estudis que analitzen tan l'extracció com les mix de qRT-PCR per la detecció del PRRSV en FO. Chittick *et al.*, 2011 utilitzant animals inoculats amb PRRSV2 extreuen l'RNA de FO recollits en les primeres quatre setmanes d'excreció emprant kits comercials, alguns d'ells modificats. Tot i que l'espècie vírica i el tipus de mostra són diferents, aquest estudi pot servir com a referent. La combinació que els va donar millors resultats va ser la d'augmentar el volum de la mostra i dels reactius de la lisi cel·lular en el protocol del *kit* MagMAX™, juntament amb el doblament de la quantitat d'enzims d'una mix de qRT-PCR comercial.

El segon estudi és més semblant al nostre. Decorte *et al.*, 2013 van contaminar FO amb la soca de Lelystad (PRRSV1) en les mateixes concentracions que les nostres. Entre els quatre *kits* que van avaluar hi havia el MagMAX™, modificat com en l'estudi de Chittick *et al.*, 2011, i el High Pure. No van detectar diferències significatives entre eficiències però sí que, amb una mix determinada, el límit de detecció pel MagMAX™ va ser d'1 TCID₅₀/mL, mentre que pel High Pure va ser de 100 TCID₅₀/mL. De fet, els seus resultats van ser similars als nostres, tot i que nosaltres vam utilitzar un ventall de *kits* més ampli i, en comptes de tres rèpliques en vam incloure nou.

Pensem que aquests dos estudis van ajudar a establir el protocol específic per la detecció del PRRSV en FO que es presenta actualment amb el *kit* MagMAX™, el qual apliquem nosaltres, ja que són molt similars.

En el nostre cas, la intenció no era optimitzar un *kit* concret sinó analitzar aquest pas dins d'un protocol global i des d'una perspectiva pràctica en el context d'un laboratori de diagnòstic. Per això vam escollir un ventall de sis *kits* disponibles actualment en el mercat, on quedessin representats els diferents mètodes d'extracció. En vam seguir estrictament el protocol, sense modificacions, però

considerant sempre extreure la màxima concentració d'RNA possible (mínim volum d'elució indicat pel fabricant). Vam obtenir una eficiència per sobre del 91% en tots els kits, per tant, tots estarien dins del rang esperat, i és més, considerem que les petites variacions no vindrien tan pel mètode emprat com per la qualitat o especificitat envers als FO de cada kit comercial. No obstant, sí que en destacaríem tres, el TRIzol® (mètode de referència), el NucleoSpin® (columnes de sílice) i el MagMAX™ (boles magnètiques), les eficiències dels quals es mantenen per sobre de la resta.

En conseqüència, la nostra recomanació seria seleccionar un d'aquests tres mètodes segons els recursos de què es disposa, el volum de mostres a analitzar, la necessitat d'augmentar la sensibilitat en mostres suposadament al límit de la detecció i l'experiència de l'operari. Per exemple, si cal analitzar poques mostres però amb un mètode que asseguri la màxima sensibilitat i es disposa d'un operari expert, es recomanaria el TRIzol®. Si en canvi, es disposa de pocs recursos i no hi ha massa volum de mostres, el NucleoSpin® seria una bona opció. I, si es vol optar per un mètode automatitzat perquè es disposa de recursos i d'un alt volum de mostres, el MagMAX™ seria el mètode més adequat.

Pel que fa a les mix de qRT-PCR, no hi ha grans diferències però semblaria que tot el que guanyaria l'AgPath™ en especificitat d'encebadors ho compensaria el sistema de l'LSI VetMAX® en funcionar millor en els fluids orals. Aquest resultat coincidiria amb l'estudi de Gerber *et al.*, 2013 on, de tres mix provades, l'LSI VetMAX® era la que donava sensibilitats més altes. Per tant, recomanaríem que quan es tracti de la detecció d'una soca ben coneguda de la qual es disposa dels encebadors, utilitzar l'AgPath™. En canvi, si el que ens arriba és una soca de camp totalment desconeguda, millor utilitzar l'LSI VetMAX®.

De fet, i coincidint amb els estudis de Chittick *et al.* (2011) i Decorte *et al.* (2013), com més s'intenti pal·liar l'efecte dels inhibidors, ja sigui millorant les reaccions enzimàtiques o augmentant l'especificitat dels encebadors, millors resultats s'obtindran.

En el tercer estudi volíem veure si les pèrdues d'eficiència presentades en els treballs previs podrien ser rellevants en situacions de baixa prevalença. Per fer-ho vam simular la detecció del PRRSV a partir de FO recollits a l'entrada i durant el monitoratge de les transicions. Vam començar a construir un model epidemiològic per analitzar tot el que passava en una granja endèmica estable quan plantejàvem diversos escenaris. No obstant, la incertesa introduïda era gran ja que la major part de les dades necessàries havien de ser aproximacions. Per tant, ja que l'únic objectiu era marcar els límits de l'eficàcia de la detecció del PRRSV en els FO, vam optar pel càlcul de probabilitats. Tanmateix, considerem que seria una eina interessant i útil la construcció d'un model epidemiològic per crear varis escenaris on es pogués preveure la circulació del PRRSV en granges amb diferents estats.

A partir dels resultats obtinguts queda palès que les pèrdues d'eficiència que es donen des de la recollida de les mostres a l'anàlisi al laboratori no són l'element més crític per la detecció del virus. En el pitjor dels escenaris, un animal excretant 10^2 còpies genòmiques/mL entre 50 animals negatius, resulta en dues còpies genòmiques/mL, uns nivells que detectaríem en la majoria d'ocasions. Quan anem a grups més grans, un sol individu ja seria difícilment detectat; a més, caldria tenir en compte que un animal malalt podria no tenir la mateixa probabilitat de xuclar la corda que la resta.

El factor més limitant seria la baixa freqüència de parts virèmics en les maternitats, que condicionaria la distribució dels animals en els corrals de transició i la irregularitat de lots positius i negatius. S'han explorat diferents escenaris de prevalença de parts amb virèmics i grandàries de granja. En general, en granges de menys de 1.000 truges, incidències inferiors al 2% resulten sovint en l'absència d'animals virèmics en els lots de transició. Alternativament, en les granges de menys de 2.000 truges amb menys d'un 2% de parts virèmics, aquests esdevenen un fenomen rar i, per tant, resulta quasi imprescindible el monitoratge de tots els corrals per a detectar-ne un d'infectat. En escenaris de major prevalença, la probabilitat de falsos negatius és molt petita. Així doncs, l'ús de FO pot ser adient pel monitoratge de transicions en la majoria de situacions; no obstant, en les

situacions de baixa prevalença, potser convindria afegir algun mètode de mostreig addicional i dirigit (p.ex. sèrum o cordons umbilicals de nascuts dèbils, etc.).

En conjunt, els resultats de la present tesi poden contribuir a fixar els criteris d'utilització dels FO per al monitoratge del PRRSV1. Segons la informació aportada en aquest treball i altres estudis, els FO serien una bona eina per la vigilància de transicions, sobretot en granges endèmiques, ja que ens permetrien detectar la circulació del virus passat el pic epidèmic. A més, només que s'optimitzin els passos on hi podria haver una pèrdua d'eficiència, la sensibilitat és alta. Per tant, en un programa de control, els FO pel monitoratge de transicions amb prevalences majors del 2% serien una eina diagnòstica adequada per detectar la circulació vírica. En canvi, en un programa de control on les prevalences estiguin per sota del 2% i es vulgui detectar el virus precoçment a l'entrada de les transicions, els FO serien útils però complementats amb alguna altra tècnica diagnòstica. La nostra proposta seria que, per aquelles granges properes a l'estabilitat i que desitgen eradicar, s'emprés la qRT-PCR en FO per a detectar el PRRSV1 a l'entrada de les transicions. Els resultats positius, indicarien que la granja encara no és estable; els resultats negatius podrien però ser compatibles amb situacions de molt baixa prevalença/incidència de virèmics. En aquest darrer cas, s'hauria de complementar el diagnòstic mostrejant FO d'animals de finals de transició per tal de determinar la presència d'anticossos o, alternativament virus. El mostreig dirigit als animals recent nascuts dèbils, amb la presa de cordons umbilicals podria afegir certesa a l'estat d'estabilitat. Amb aquesta aproximació es pot realitzar un monitoratge de la infecció sense necessitat de sagnar els animals ni sotmetre'ls a cap procediment contrari al seu benestar.

BIBLIOGRAFIA DISCUSSIÓ

- Bierk, M.D., Dee, S. a., Rossow, K.D., Otake, S., Collins, J.E., Molitor, T.W., 2001. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can. J. Vet. Res.* 65, 261–266.
- Cano, J.P., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Rovira, A., Morrison, R.B., 2009. Infection dynamics and clinical manifestations following experimental inoculation of gilts at 90 days of gestation with a low dose of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 73, 303–7.
- Chittick, W.A., Stensland, W.R., Prickett, J.R., Strait, E.L., Harmon, K., Yoon, K.-J., Wang, C., Zimmerman, J.J., 2011. Comparison of RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine oral fluid specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23, 248–53.
- Decorte, I., Van Campe, W., Mostin, L., Cay, A.B., De Regge, N., 2015. Diagnosis of the Lelystad strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in individually housed pigs: comparison between serum and oral fluid samples for viral nucleic acid and antibody detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27, 47–54.
- Decorte, I., Van der Stede, Y., Nauwynck, H., De Regge, N., Cay, A.B., 2013. Effect of saliva stabilisers on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid by quantitative reverse transcriptase real-time PCR. *Vet. J.* 197, 224–8.
- Gerber, P.F., O'Neill, K., Owolodun, O., Wang, C., Harmon, K., Zhang, J., Halbur, P.G., Zhou, L., Meng, X.-J., Opriessnig, T., 2013. Comparison of commercial real-time reverse transcription-PCR assays for reliable, early, and rapid detection of heterologous strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected or noninfected boars by use of different. *J. Clin. Microbiol.* 51, 547–56.
- Gibert E., Pileri E., Cano E., López RM., López-Soria S., Martín-Valls GE., M.E., 2014. Experimental evaluation of individual and collective oral fluid sampling for the early detection of PRRSV infected animals, in: 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Cancun, Mexico, p. 559.
- Hermann, J.R., Muñoz-Zanzi, C.A., Roof, M.B., Burkhart, K., Zimmerman, J.J., 2005. Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. *Vet. Microbiol.* 110, 7–16.
- Holtkamp, D.J., 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J. Swine Heal. Prod.* 21, 72–84.
- Holtkamp, D.J., Polson, D.D., Torremorell, M., Morrison, B., Classen, D.M., Becton, L., Henry, S., Rodibaugh, M.T., Rowland, R.R., Snelson, H., Straw, B., Yeske, P., Zimmerman, J., 2011. [Terminology for classifying the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) status of swine herds]. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere. Nutztiere.* 39, 101–12.
- Kittawornrat, A., Prickett, J., Chittick, W., Wang, C., Engle, M., Johnson, J., Patnayak, D., Schwartz, T., Whitney, D., Olsen, C., Schwartz, K., Zimmerman, J., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res.* 154, 170–6.
- Martínez-Lobo, F.J., Díez-Fuertes, F., Segalés, J., García-Artiga, C., Simarro, I., Castro, J.M., Prieto,

- C., 2011. Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model. *Vet. Microbiol.* 154, 58–68.
- Olsen, C., Karriker, L., Wang, C., Binjawadagi, B., Renukaradhya, G., Kittawornrat, A., Lizano, S., Coetzee, J., Main, R., Meiszberg, A., Panyasing, Y., Zimmerman, J., 2013. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet. J.* 198, 158–63.
- Prickett, J., 2009. Detection of viral pathogens of swine using oral fluid specimens. *Grad. Theses Diss.*
- Prickett, J., Simer, R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.-J., Evans, R.B., Zimmerman, J.J., 2008. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 156–63.
- Prickett, J.R., Kim, W., Simer, R., Yoon, K.-J., Zimmerman, J., 2008. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Heal. Prod* 16, 86–91.
- Ramirez, A., Wang, C., Prickett, J.R., Pogranichniy, R., Yoon, K.-J., Main, R., Johnson, J.K., Rademacher, C., Hoogland, M., Hoffmann, P., Kurtz, A., Kurtz, E., Zimmerman, J., 2012. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev. Vet. Med.* 104, 292–300.
- Romagosa, A., Gramer, M., Joo, H.S., Torremorell, M., 2012. Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza Other Respi. Viruses* 6, 110–118.
- Rowland, R.R., Lawson, S., Rossow, K., Benfield, D.A., 2003. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet. Microbiol.* 96, 219–235.
- White, D., Rotolo, M., Olsen, C., Wang, C., Prickett, J., Kittawornrat, A., Panyasing, Y., Main, R., Rademacher, C., Hoogland, M., Zimmerman, J.J., 2014. Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *J Swine Heal. Prod* 22, 138–141.
- Wills, R.W., Doster, A.R., Galeota, J. a, Sur, J., Osorio, F. A., 2003. Duration of Infection and Proportion of Pigs Persistently Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Duration of Infection and Proportion of Pigs Persistently Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Clin Microbiol*, 41:58-62.

CONCLUSIONS

1. L'excreció del virus del PRRS en els fluids orals dels animals sense immunitat prèvia es produeix almenys durant el període virèmic, observant-se en alguns casos animals que continuen excretant el virus un cop cessada la virèmia. Aquest resultat indica que, individualment, fluids orals i sèrum poden arribar a ser mostres diagnòstiques equivalents.
2. En els animals amb immunitat prèvia, l'excreció del virus de camp en els fluids orals pot produir-se en absència de virèmia però el patró d'excreció és intermitent. La utilització dels fluids orals com a matriu per al monitoratge d'animals vacunats (p.ex. truges de reposició) és més incert.
3. El temps d'emmagatzematge i la temperatura de conservació són dos factors claus per tal d'assegurar l'obtenció de resultats fiables en la detecció del virus del PRRS per qRT-PCR en els fluids orals. En aquest procés no s'haurien d'ultrapassar les 24h a 4°C.
4. La detecció del virus en les mostres de fluids orals que contenen 10^0 TCID₅₀/mL era significativament superior quan les mostres es centrifugaven abans de l'extracció de l'RNA. Considerant que els animals excretors tenen una càrrega vírica de l'ordre de 10^2 - 10^4 còpies genòmiques/mL de fluid oral, el procediment de centrifugació pot ser necessari per assegurar la detecció del PRRSV1 en les mostres col·lectives que continguin quantitats de virus límit, com per exemple en sistemes de baixa prevalença d'infecció.
5. A nivell pràctic qualsevol dels mètodes validats és capaç de detectar el PRRSV1 en les concentracions normals d'excreció en els fluids orals. Tanmateix, es detecten petites diferències d'eficiència pels diversos kits d'extracció de l'RNA.
6. La utilització dels reactius AgPath o LSI VetMAX resulten en valors de Ct diferents per mostres equivalents de fluids orals infectats. No obstant, si es considera la seva eficàcia diagnòstica en relació als nivells de virus esperats en els fluids orals, les diferències observades probablement no tindrien un impacte pràctic.
7. El càlcul de probabilitats mostra que els fluids orals són un medi adequat per al monitoratge de transicions en situacions de baixa prevalença, essent la freqüència de virèmics al naixement, el nombre d'animals per corral i el nombre de corrals mostrejats molt més importants per evitar diagnòstics falsament negatius.

ANNEX

En aquest annex es mostra una compilació d'articles publicats o enviats a publicar, i aportacions a congressos internacionals durant la realització d'aquesta tesi.

1. Altres publicacions

Pileri E., Gibert E., Soldevila F., García-Saenz A., Pujols J., Diaz I., Darwich L., Casal J., Martín M., Mateu E., 2015. Vaccination with a genotype 1 modified live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus significantly reduces viremia, viral shedding and transmission of the virus in a quasi-natural experimental model. *Vet. Microbiol.* 175, 7–16.

2. Aportacions a congressos internacionals

E. Gibert, E. Pileri, E. Cano, R.M. López, S. López-Soria, G.E. Martín-Valls and E. Mateu. Experimental evaluation of individual and collective oral fluid sampling for the early detection of PRRSV – infected piglets. Proc 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Cancún, México. 2014. Pòster.

E. Gibert, E. Pileri, E. Cano, G.E. Martín-Valls, E. Mateu. In vitro comparison of several matrices for the individual or collective sampling of oral fluids in pigs for PRRS virus detection by quantitative RT-PCR. Proc 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Cancún, México. 2014. Pòster.

E. Gibert, E. Pileri, G.E. Martín-Valls, E. Cano and E. Mateu. *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) shedding in oral fluids of naïve and vaccinated pigs exposed to the wild-type virus. Proc International PRRS Congress. Ghent, Bèlgica. 2015. Comunicació oral.

E. Gibert, G.E. Martín-Valls, E. Cano and E. Mateu. Comparison of processing, RNA extraction methods and qRT-PCR mixes for the diagnosis of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) infection using oral fluids. Proc International PRRS Congress. Ghent, Bèlgica. 2015. Comunicació oral.

Aquesta presentació va obtenir el premi a la millor comunicació oral del congrés.

