

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

DISCIPLINE ANATOMOISTOPATOLOGICHE VETERINARIE
Ciclo XXIII

Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza: VET 03

TITOLO TESI

**PATOLOGIE DA PORCINE CIRCOVIRUS TIPO 2 (PCV2) NEL
SUINO**

Presentata da: Dott.ssa Laura Fusaro

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Giuliano Bettini

Prof. Giuseppe Sarli

Esame finale anno 2011

INDICE

CAPITOLO 1: Patologie da Porcine Circovirus type 2 (PCV2) nel suino	3
1.1. Introduzione	3
1.2. Caratteristiche dell'agente eziologico	4
1.3. Sindrome da deperimento organico post-svezzamento (PMWS)	6
1.4. Polmonite Proliferativa e Necrotizzante (PNP)	9
1.5. Sindrome Dermatite-Nefrite Suina (PDNS)	11
1.6. Patologia riproduttiva	14
1.7. Enterite granulomatosa	15
CAPITOLO 2: Diagnosi di PMWS in Italia	17
2.1. Introduzione	17
2.2. Materiali e Metodi	17
2.2.1. Casistica	17
2.2.2. Esame anatomico-istopatologico ed immunohistochimico	18
2.3. Diagnosi	19
2.4. Risultati	27
2.4.1. Esame necroscopico	27
2.4.2. Istologia del tessuto linfoide	28
2.4.3. Istopatologia del polmone	33
2.5. Discussione	35
2.6. Conclusioni	40
Produzione scientifica originale	41
CAPITOLO 3: Il ruolo di PCV2 nella Polmonite Proliferativa e Necrotizzante del suino	42
3.1. Introduzione	42

3.2. Materiali e Metodi	46
3.3. Risultati	47
3.4. Discussione	49
3.5. Conclusioni	51
Produzione scientifica originale	52
CAPITOLO 4: Il ruolo di PCV2 nella patologia riproduttiva del suino	53
4.1. Introduzione	53
4.2. Obiettivo	58
4.3. Materiali e metodi	58
4.3.1. Animali	58
4.3.2. Protocollo sperimentale	59
4.3.3. Campionamento ante-mortem	60
4.3.4. Campionamento post-mortem	61
4.3. 5. Indagini sierologiche	62
4.3.6. Metodica PCR	62
4.4. Risultati	63
4.4.1. Esame istologico e immunoistochimico	67
4.5. Discussione	70
4.6. Conclusioni	72
Produzione scientifica originale	74
BIBLIOGRAFIA	75

CAPITOLO 1: Patologie da Porcine Circovirus type 2 (PCV2) nel suino

1.1. Introduzione

A partire dagli anni '90 del secolo scorso, l'allevamento intensivo del suino è andato incontro a importanti modificazioni, soprattutto per far fronte all'aumento delle richieste produttive verificatosi a livello mondiale. La globalizzazione del commercio con il conseguente aumento di scambi di animali e prodotti di origine animale, i progressi della genetica, dell'alimentazione, del management e della sanità, hanno dato un contributo significativo a questo sviluppo. Alcuni dei maggiori cambiamenti a cui è andato incontro il sistema produttivo sono stati: l'aumento delle dimensioni delle aziende con separazione delle fasi produttive, l'utilizzo di siti di produzione ad alta densità, l'aumento del numero di suinetti prodotti per scrofa per anno, la pratica dello svezzamento precoce, la messa in atto di strette misure di biosicurezza, la necessità di eradicare alcune malattie la cui presenza, oltre ai danni diretti, costituisce un ostacolo agli scambi commerciali internazionali di animali vivi e di prodotti di origine animale.

In particolare, il miglioramento delle pratiche igienico sanitarie ha consentito di ottenere allevamenti high health, cioè esenti da alcune delle più comuni malattie respiratorie ed enteriche del suino quali polmonite da *Mycoplasma hyopneumoniae* e da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, rinite atrofica, salmonellosi, dissenteria suina, gastroenterite trasmissibile e malattia di Aujeszky. E' inoltre notevolmente aumentata la disponibilità di vaccini, spesso somministrati anche ad animali molto giovani. Tutti questi importanti cambiamenti hanno però favorito l'emergere o il riemergere di alcune malattie infettive, in particolare alcune infezioni virali. A fronte dell'eradicazione o della

drastica riduzione dell'incidenza delle "classiche" malattie caratterizzate da alta virulenza e da forme cliniche ben evidenti (ad esempio: afta, peste suina classica, peste suina africana), si è infatti assistito alla comparsa di "nuove" patologie caratterizzate da multifattorialità, andamento endemico, bassa risposta immunitaria, ampia variabilità di segni clinici, stretta dipendenza dai fattori ambientali e di management, buona capacità di trasmissione, capacità di adattarsi e sopravvivere ai cambiamenti apportati alle pratiche di allevamento. Tra gli agenti responsabili di questo tipo di infezioni si possono annoverare alcuni virus a DNA circolare, come il circovirus suino tipo 2 (PCV2) e virus circovirus-simili, come i recentemente identificati Torque Teno virus (TTV) (Fusaro et al, 2009).

1.2. Caratteristiche dell'agente eziologico

Circovirus è stato identificato nel suino per la prima volta nel 1974 e ascritto alla famiglia dei picornavirus-like, contaminante della linea cellulare continua di rene suino PK/15 (Tischer *et al.*, 1982). Più tardi, nel 1983, PCV è stato descritto nella forma che si riconosce attualmente e inserito nella famiglia dei Circoviridae. Successivamente, l'emergenza nella popolazione suina mondiale di un PCV nuovo dal punto di vista antigenico e genomico distinto ha indotto gli studiosi a chiamarlo PCV2 per differenziarlo dal ceppo originario PCV1 contaminante delle cellule PK15 (Allan e Ellis, 2000). Recentemente, sulla base dell'analisi di sieri monoclonali e policlonali, si è dimostrata effettivamente l'esistenza di due specie virali distinte, il PCV1 e il PCV2, quest'ultimo correlato a svariati quadri patologici (Grau-Roma *et al.*, 2010).

PCV2 è stato accertato per la prima volta nel 1998 in Canada in allevamenti di suini Specific Pathogen Free (SPF) dove fu associato alla sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (post-weaning multisystemic wasting syndrome – PMWS); poi in America del Nord (Allan *et al.*, 1998; Kiupel *et al.*, 1998), Europa (Allan *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 1998; Hinrichs

et al., 1999) e Asia. La patologia è il risultato di una compromissione immunitaria su base virale ma le cui manifestazioni cliniche sono riportabili ad infezioni secondarie di varia natura. In Italia, la sua comparsa è stata segnalata da Marcato nel 1998 in suinetti di età compresa fra 6 e 18 settimane ma soltanto nelle sue manifestazioni anatomico-istopatologiche (Marcato *et al.*, 1999). Da allora il coinvolgimento di PCV2 è stato riconosciuto anche in altre forme patologiche del suino quali la sindrome dermatite nefrite (PDNS), alcune malattie respiratorie del suino (inclusa la polmonite proliferativa e necrotizzante – PNP), la linfadenite necrotizzante e l'enterite granulomatosa (Harding, 2004; Chae, 2005, Segalés *et al.*, 2005). Tutte queste patologie sono ora identificate dall'acronimo PCVDs (porcine circovirus diseases) in Europa e PCVDA (porcine circovirus associated diseases) in America (Segalés *et al.*, 2005; Opriessnig *et al.*, 2007).

Il Circovirus suino è un virus molto piccolo in grado di replicare autonomamente in cellule di mammifero. Il genoma virale è costituito da un singolo filamento di DNA (ssDNA) circolare, chiuso da legami covalenti e per questo chiamato “Porcine Circovirus” (PCV) (Tischer *et al.*, 1982). La particella virionica ha una struttura icosaedrica ed è priva di envelope.

Basandosi su prove con anticorpi monoclonali e policlonali verso PCV-1, il virus fu isolato da feti suini abortiti, da suinetti con tremori congeniti (tipo A-II) (Hines e Lukert, 1994) e successivamente il DNA di PCV-1 è stato identificato in Francia da linfonodi di un suinetto affetto da una sindrome da deperimento.

Un nuovo Circovirus è stato invece isolato per la prima volta in Canada (Ellis *et al.*, 1998) da suini affetti da sindrome da deperimento organico. Poco tempo dopo la scoperta del nuovo virus in Canada, agenti eziologici pressoché identici furono isolati da suini malati in America del nord (Opriessnig *et al.*, 2007), Europa (Allan *et al.*, 1998; Hinrichs *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 1998; Segalés *et al.*, 2005) e Asia controllando i quali, tramite antisieri monoclonali e policlonali, si è dimostrato come fossero delle entità biologiche distinte. Solo recentemente il PCV-1 e il PCV-2 sono diventati 2 specie virali distinte (Grau-Roma *et al.*, 2010).

Le forme patologiche sostenute da PCV2 rappresentano una causa di rilevanti perdite economiche negli allevamenti suinicoli a livello mondiale. Queste patologie, attualmente definite come Porcine Circovirus Associated Diseases (PCVAD) in Nordamerica e " Porcine Circovirus Disease" (PCVD) in Europa (Segalés *et al.*, 2005; Opriessnig *et al.*, 2007) sono associate a diverse manifestazioni cliniche che colpiscono animali in fase di accrescimento (postweaning multisystemic wasting disease, PMWS; forme respiratorie PCV2 indotte nell'ambito della porcine respiratory disease complex; porcine dermatitis nephritis syndrome (PDNS); patologia enterica; problematiche della sfera riproduttiva) e che sono la causa di imponenti perdite economiche nell'industria suinicola a livello mondiale.

1.3. Sindrome da deperimento organico post-svezzamento (PMWS)

Nel 1991 fu identificata per la prima volta, in suini provenienti dal Canada, una sindrome caratterizzata da deperimento organico e nel 1996 fu riportato uno studio pionieristico sull'argomento (Clark, 1996; Harding, 1996). Proprio per le caratteristiche della malattia, che consistono in una progressiva perdita di peso associata a lesioni in vari organi di suinetti appena svezzati, fu proposto dagli autori il nome di "Sindrome da deperimento organico post-svezzamento" (Post-weaning multisystemic wasting syndrome).

Antigeni e acido nucleico di PCV-2 furono abbondantemente dimostrati nelle lesioni multisistemiche dei suinetti malati e successivamente il virus stesso fu isolato (Ellis *et al.*, 1998).

Nel 1997, LeCann e colleghi riportarono, in uno studio effettuato nel Nord della Francia, una sindrome da deperimento organico in suini appena svezzati ma non riuscirono ad isolare nessun agente causale. In seguito, le analisi di campioni conservati e provenienti dallo stesso studio risultarono positive per PCV2 (LeCann *et al.*, 1997).

Ad oggi la patologia viene comunemente diagnosticata e riscontrata in suini provenienti da

allevamenti ad elevato status sanitario. Inoltre, in buona parte degli allevamenti infetti da PCV2 non sono mai stati evidenziati particolari problemi produttivi o sanitari. Tali osservazioni, unite al fatto che in suini affetti da PMWS sono stati spesso identificati anche altri agenti infettivi quali, ad esempio, parvovirus suino (PPV), virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV), virus della malattia di Aujeszky, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *E. coli*, *Haemophilus parasuis*, salmonelle, streptococchi, stafilococchi, hanno fatto ipotizzare che altri microrganismi patogeni o le condizioni d'allevamento possano avere un peso rilevante nell'insorgenza della PMWS. L'infezione da PCV2 sarebbe quindi una condizione necessaria ma non sufficiente per la piena espressione della PMWS. In questo senso, la PMWS andrebbe quindi vista come una patologia condizionata a eziologia multifattoriale.

Più comunemente PMWS colpisce suini di età compresa tra le 5 e le 12 settimane di vita. I sintomi clinici di più frequente riscontro sono: deperimento e cachessia, dispnea, linfadenomegalia superficiale e meno frequentemente pallore, diarrea ed ittero (Ellis *et al.*, 1998; Harding, 1996). La morbilità e la mortalità associate a PMWS variano molto in base allo stadio della malattia e al management dell'allevamento. In focolai acuti isolati la mortalità totale può raggiungere il 10%, mentre mortalità e morbilità in allevamenti endemici sono sensibilmente minori. Gli animali infetti possono superare la patologia e non mostrare più segni clinici anche se questa evenienza è scarsamente documentata. Fattori predisponenti come affollamento, elevata promiscuità di animali della stessa età e scarsa qualità dell'aria all'interno dei capannoni possono esacerbare la patologia (Harding *et al.*, 1998).

Le lesioni anatomopatologiche riferibili a PMWS sono aspecifiche e variano dal collasso polmonare ad aree di consolidamento del parenchima respiratorio localizzato alle aree cranio-ventrali che assumono un aspetto "carnoso". Solitamente nei suini affetti viene riscontrata una linfadenopatia sistemica marcatamente rappresentata a livello dei linfonodi inguinali, mesenterici, bronchiali e mediastinici che assumono un aspetto pallido e omogeneo sulla superficie di taglio (Marcato *et al.*,

2002).



Figura 1.1. Aumento della percentuale di scarti e/o di morti nel post-svezzamento.

L'esame istopatologico dei tessuti linfoidei (linfonodi, tonsille, milza, timo e placche del Peyer) mette in evidenza una deplezione linfo-citaria, talvolta una flogosi di tipo granulomatoso con infiltrazione linfo-stiocitaria di numerosi tessuti e comparsa di cellule giganti polinucleate (linfadenite macrofagica sinciziale e microgranulomi) e nell'1% dei casi la presenza di corpi inclusi anfo-filici intracitoplasmatici.. Altri organi possono essere interessati come i polmoni, il fegato e i reni in cui si rilevano quadri infiammatori interstiziali (Chae, 2004; Segalés *et al.*, 2005).

PCV2 con tutta probabilità si trasmette da allevamento ad allevamento tramite la movimentazione degli animali. La possibilità di trasmissione verticale di PCV2 è stata oggi dimostrata, ma non è ancora ben chiara la sua importanza (Segalés *et al.*, 2004).

Numerose indagini hanno dimostrato che in Italia, analogamente ad altri Paesi, l'infezione da PCV2 è estremamente diffusa. Scarse sono invece le informazioni relative alla reale incidenza dei focolai di PMWS e questa carenza di dati epidemiologici è probabilmente da ascrivere, almeno in parte, alla complessità dell'iter diagnostico. La diagnosi di PMWS richiede una buona integrazione dell'anamnesi aziendale e delle osservazioni cliniche compiute su gruppi di soggetti con i dati

ricavati dalle analisi di laboratorio.

Le conoscenze relative a: percentuale di mortalità e di scarti nella fase di svezzamento, incidenza di patologie respiratorie e intestinali in questa fase, età di comparsa e di attenuazione dei sintomi, perdita di efficacia dei trattamenti terapeutici, peggioramento dei principali indici zootecnici, sono infatti fondamentali per avanzare un sospetto di PMWS. Analogamente, devono essere presi in considerazione anche gli eventuali fattori di rischio presenti in azienda quali: densità dei capi, qualità dell'aria, eventuali rimescolamento di gruppi di suini di età differenti, tipologia di vaccini impiegati e loro schemi di somministrazione, eventuali cambiamenti del management aziendale.

Queste evidenze dovranno essere integrate con i risultati delle analisi di tipo istopatologico tendenti ad evidenziare la presenza di PCV2 all'interno delle caratteristiche lesioni (Segalés *et al.*, 2005).

Solo in questo modo è possibile affrontare correttamente la diagnosi di PMWS e successivamente implementare quelle misure di controllo (biosicurezza, buone pratiche di allevamento, eventuale profilassi vaccinale) atte a ridurre il grave danno economico causato dalla malattia. In caso contrario, protocolli diagnostici non corretti potrebbero portare alla messa in evidenza di problematiche sanitarie confutabilmente legate all'infezione con PCV2, riducendo drasticamente la possibilità di applicare efficaci misure di controllo e di trarne vantaggio.

1.4. Polmonite Proliferativa e Necrotizzante (PNP)

La polmonite proliferativa e necrotizzante (proliferative and necrotizing pneumoniae – PNP) è una grave forma di polmonite interstiziale che colpisce suinetti durante il periodo dello svezzamento, ma anche dopo, a un'età di circa 4-16 settimane. È stata descritta per la prima volta in Canada nel 1990 da Morin e colleghi (Morin *et al.*, 1990). All'esame macroscopico la polmonite è caratterizzata da consolidamento del parenchima, colore dal rosso-bruno al grigiastro con lesioni generalmente localizzate nei lobi medi e nelle porzioni cranioventrali dei lobi caudali. L'esame microscopico

mette in evidenza aggregati di cellule necrotiche e detriti granulari negli spazi alveolari associati a iperplasia e ipertrofia dei pneumociti di tipo II (Fig. 2) (Morin *et al.*, 1990; Larochelle *et al.*, 1994; Drolet *et al.*, 2003; Segalés *et al.*, 2004). Si ritrovano inoltre quadri di polmonite interstiziale di gravità variabile, con o senza lesioni di bronchiolite e/o broncopolmonite.

L'eziologia di PNP rimane controversa. Il primo agente eziologico considerato negli studi canadesi (Morin *et al.*, 1990; Austin e Bystom, 1991; Dea *et al.*, 1992; Girard *et al.*, 1992) è stato il virus dell'influenza suina (SIV); più recentemente è stato considerato anche il virus della malattia di Aujeszky (Segalés *et al.*, 1997; Grau-Roma and Segalés, 2007). Larochelle e colleghi in uno studio del 1994 hanno invece dimostrato la presenza del virus della PRRSV in 28 polmoni con polmonite su 38 (Larochelle *et al.*, 1994). Studi successivi americani (Drolet *et al.*, 2003) ed europei (Pesch *et al.*, 2000; Grau-Roma e Segalés, 2007) hanno poi associato i due virus, PRRSV e PCV2 nel quadro eziologico, dal momento che frequentemente sono presenti entrambi in polmoni con PNP. In ogni caso, i risultati ottenuti da questi due filoni di studio hanno mostrato delle differenze. I primi hanno evidenziato costantemente il PRRSV in corso di PNP, mai unico agente eziologico ma co-presente con PCV2. I secondi hanno descritto in un totale di 79 polmoni, la coinfezione PCV2-PRRSV come la più frequente (30 polmoni), seguita dal PCV2 come unico agente eziologico (29 polmoni), l'associazione PCV2-SIV e PRRSV come unica causa in 3 casi, la co-presenza PCV2-ADV in un solo caso. In entrambi gli studi in una certa percentuale di polmoni con PNP (7 e 10% rispettivamente) non è stata rilevata la presenza di nessun agente eziologico fra quelli studiati. Da ciò risulta che ancora molto deve essere approfondito e studiato.

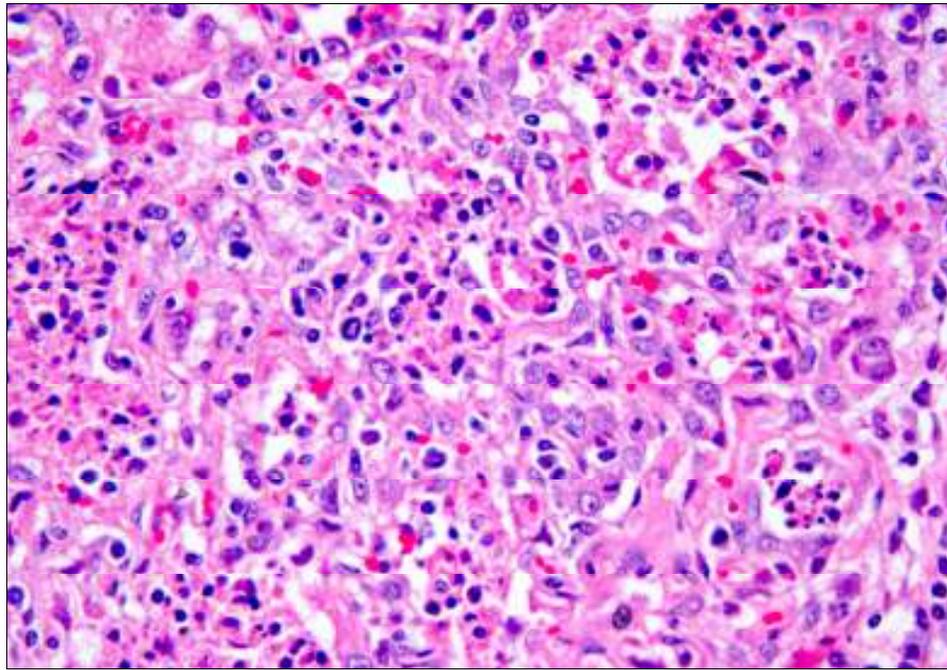


Figura 1.2. Suino. Polmone. La sezione mostra ipertrofia ed iperplasia degli pneumociti di II tipo e materiale necrotico intralveolare. L'interstizio mostra un lieve infiltrato infiammatorio mononucleato, E&E. 40x.

1.5. Sindrome Dermatite-Nefrite Suina (PDNS)

La Sindrome Dermatite-Nefrite Suina (PDNS) è stata descritta per la prima volta nel 1993 in U.K. e da quel momento è stata ampiamente riscontrata nella maggior parte dei paesi in cui l'allevamento suino è diffuso. Stati utilizzati numerosi nomi per indicarla tra cui “vasculite necrotizzante sistemica del suino”, “sindrome glomerulonefrite-dermatite da immunocomplessi” anche se “sindrome dermatite-glomerulonefrite suina” è la denominazione più comune (Drolet *et al.*, 1999).

È una patologia relativamente nuova, spesso fatale, di eziologia sconosciuta che colpisce i suinetti appena svezzati e quelli in fase post-svezzamento da 1,5 a 4 mesi di età, sporadicamente in soggetti appartenenti ad altre fasce di età (Smith *et al.*, 1993; Thibault *et al.*, 1998).

Le lesioni di questa sindrome sono fortemente suggestive di un disordine mediato da immunocomplessi, sospetto già evidenziato nei primissimi studi condotti sulla malattia. I lavori sperimentali eseguiti, grazie all'uso di tecniche immunopatologiche, hanno dimostrato la presenza di

tali complessi Ag-Ab nelle pareti vasali e nei glomeruli renali. Alla microscopia elettronica i reni affetti rivelano depositi densi a livello della membrana basale (Drolet *et al.*, 1999).

La lesione più evidente in soggetti vivi clinicamente affetti è rappresentata da ampie chiazze leggermente rilevate, crostose ed eritematose, di colore rosso violaceo di varia forma e dimensione, localizzate a testa, petto, addome, quarti anteriori e posteriori (Figura 3). I suini sono magri, depressi e con temperatura. Si riscontrano solitamente edema sottocutaneo, soprattutto agli arti e alle palpebre, linfonodi inguinali superficiali aumentati di volume, questi ultimi reperti frequenti, se non costanti. La diarrea è comunemente presente (Drolet *et al.*, 1999).

Lesioni macro e microscopiche sono rilevabili costantemente nella cute e nel rene e altri organi possono essere affetti. Nei casi fatali, lesioni cutanee consistono di vasculite necrotizzante grave che interessa cute e sottocute, caratterizzate da infiammazione leucocitoclastica dei capillari, vene di piccola e media taglia, e arteriole, accompagnate da necrosi epidermica, ulcerazione ed emorragia dermica. I reni sono spesso aumentati di volume e pallidi, con petecchie sulla superficie. Le lesioni renali microscopiche consistono di una glomerulonefrite essudativa, nefrite interstiziale e arterite necrotizzante. I linfonodi inguinali e renali sono di solito aumentati di volume e di colore rosso (Smith *et al.*, 1993; Hélie *et al.*, 1995; Thibault *et al.*, 1998).

La percentuale nei suini affetti può raggiungere il 15% con la morte che sopraggiunge a 2 giorni dall'esordio dei sintomi. Tuttavia la mortalità può raggiungere picchi molto elevati, anche del 100% in suini oltre i 3 mesi di età (Smith *et al.*, 1993).

In due studi, la PRRSV è stata sospettata di essere coinvolta nella patogenesi di PDNS (Thibault *et al.*, 1998; Segalés *et al.*, 1998). Una grande parte di animali affetti da PDNS nello studio spagnolo (Segalés *et al.*, 1998) e tutti i suini esaminati nello studio canadese (Thibault *et al.*, 1998) erano affetti da PRRSV. Questo virus è stato per molto tempo considerato un buon candidato perché si è visto che causa vasculiti necrotizzanti negli animali sperimentalmente infettati (Cooper *et al.*, 1997) e perché potrebbe causare viremia con anticorpi co-presenti (Straw *et al.*, 1999), situazione che

potrebbe favorire lo sviluppo di immunocomplessi.



Figura 1.3. Dermatite caratterizzata da macule e papule di colore rosso o porpora tendenti alla confluenza (Foto di H. Voets)

PRRSV è ampiamente diffuso in molti paesi e più di una volta PDNS è stato osservato in allevamenti PRRSV-negativi e in aree geografiche PRRSV-free, come l'Australia (Straw *et al.*, 1999).

Queste osservazioni lasciano 3 possibilità di speculazione sul ruolo di PRSSV nella patogenesi della malattia:

- PRRSV rappresenta solo un'infezione casuale;
- PRSSV in alcuni casi può innescare un altro fattore non ancora identificato responsabile dello sviluppo di PDNS;
- PRRSV potrebbe essere una delle diverse cause potenziali della malattia.

Per confermare questa ultima teoria, sarebbe necessario identificare l'antigene virale nelle pareti vascolari danneggiate e nelle lesioni glomerulonefritiche, cosa che non è stato ancora possibile fare (Drolet *et al.*, 1999). Da qui numerosi altri studi sono stati condotti in merito ma ancora il link preciso tra le due sindromi non è stato individuato.

1.6. Patologia riproduttiva

Dalla letteratura emerge, come fattore di rischio importante per la patologia riproduttiva da PCV2, un episodio viremico che si realizza in scrofe gravide con basso titolo anticorpale specifico (Calsamiglia *et al.*, 2007). E' stato dimostrato che la trasmissione non avviene solo in corso di episodio viremico della scrofa ma PCV2 può infettare i prodotti del concepimento anche mediante veicolazione attraverso seme o ovuli infetti (Cariolet *et al.*, 2001; Bielanski *et al.*, 2004; Meteuse, 2007), o come conseguenza dell'infezione delle vie genitali (Bielansky *et al.*, 2004). Si ritiene che le infezioni fetali contratte prima del 57° giorno di gestazione (cioè prima dell'acquisizione dell'immunocompetenza fetale) siano quelle associate a conseguenze più gravi. In questi casi la morte del feto e la sua successiva mummificazione sono degli eventi frequenti e sarà possibile mettere in evidenza il virus nei tessuti fetali in assenza di reattività sierologica specifica per PCV2. Viceversa, infezioni fetali che si realizzano dopo l'acquisizione dell'immunocompetenza possono causare aborto e natimortalità; in questo caso, i suinetti sono sieropositivi e, in dipendenza dell'età gestazionale a cui è avvenuta l'infezione, anche positivi al virus (Pensaert *et al.*, 2004).

E' stato dimostrato in numerosi studi sperimentali che PCV2 può infettare i prodotti del concepimento veicolato da seme o ovuli infetti (Cariolet *et al.*, 2001; Bielansky *et al.*, 2004; Mateusen, 2007) o come conseguenza dell'infezione delle vie genitali (Bielansky *et al.*, 2004).

Il virus può raggiungere i prodotti del concepimento oltre che mediante trasmissione verticale con i gameti anche attraversando la placenta, sia con modalità diretta (cioè con particelle virali libere nell'interstizio), sia veicolato da macrofagi (Pensaert *et al.*, 2004).

Le principali lesioni anatomopatologiche a carico dei feti sono rappresentate dall'aumento di volume dei linfonodi, polmonite, miocardite diffusa, coalescente, non suppurativa e necrotizzante, in particolare nei soggetti nati morti o abortiti. Studi epidemiologici hanno dimostrato

un'associazione positiva tra presenza di PMWS in allevamento e aumento della percentuale di scrofe che ritornano in calore in assenza di sintomatologia clinica (Madec *et al.*, 2008). Sono la PCR e gli esami istologico e immunoistochimico a permettere di dimostrare la presenza di PCV2 all'interno delle lesioni organiche ma nell'iter diagnostico assume un certo ruolo anche l'esame sierologico (siero, liquido toracico) de i feti.

Numerosi sono i lavori sperimentali ad aver valutato il possibile ruolo di PCV2 nel determinismo di patologie riproduttive: infezioni sperimentali con inoculazione virale per via trans-uterina (Johnson *et al.*, 2002), infezione per via oro-nasale di scrofe SPF (Cariolet *et al.*, 2001) o convenzionali (Park *et al.*, 2005), inoculazioni endouterine di scrofe SPF (Rose *et al.*, 2007).

1.7. Enterite granulomatosa

Questo tipo di enterite presenta quadri clinici di diarrea inizialmente giallastra che vira al nero, con un sensibile ritardo nell'accrescimento. I dati riportati in Letteratura hanno riconosciuto una morbilità del 10-20% ed una letalità del 50-60% (Chae, 2005).

L'infiammazione intestinale granulomatosa associata a PMWS, che interessa le placche del Peyer, è caratterizzata da infiltrati di macrofagi epitelioidi e cellule giganti multinucleate. Corpi inclusi citoplasmatici organizzati a grappolo, grandi, multipli, anfofilici e basofilici, si trovano spesso nelle cellule istiocitarie e nelle cellule giganti multinucleate. Nessuna lesione microscopica è osservabile nel tessuto linfoide, come linfonodi, milza e tonsille. In uno studio condotto da un'équipe coreana (Kim *et al.*, 2004), il virus del PCV2 è stato isolato da omogenati di piccolo intestino in suini svezzati. La presenza di diarrea ed enterite granulomatosa e abbondante DNA di PCV2 associato alle lesioni microscopiche era suggestivo di enterite associata a PCV2.

Due suini facenti parte dello studio, presentavano ceco e colon interessati da necrosi multifocale, ulcere ed essudato luminale di fibrina e neutrofilo. Sulla base dei reperti clinici e macroscopici, l'enterite associata a PCV2, è stata desunta sulla base di 3 criteri: 1) presenza di diarrea; 2) presenza delle caratteristiche lesioni nelle placche del Peyer ma non nei linfonodi (infiammazione granulomatosa e deplezione linfoide non sono state osservate nei linfonodi dei 6 maiali svezzati sottoposti allo studio); 3) presenza di PCV2 nelle lesioni. Questi tre criteri presi individualmente non sono diagnostici per un'enterite associata a PCV2. È da sottolineare l'importanza di differenziare clinicamente e dal punto di vista istologico l'enterite associata a PCV2 da PMWS a causa della notevole sovrapposizione diagnostica tra le 2 condizioni. Inoltre, lo scoppio simultaneo di PMWS o PDNS non è stato osservato nell'allevamento. In questo modo, l'enterite granulomatosa PCV2-associata potrebbe essere una manifestazione clinica distinta di PCV2.

CAPITOLO 2: Diagnosi di PMWS in Italia

2.1. Introduzione

La post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) è una malattia cosmopolita, segnalata anche in Italia (Marcato *et al.*, 1999; Martelli *et al.*, 2000; Fiorentini *et al.*, 2004) e, come già detto precedentemente, sostenuta dal Porcine Circovirus tipo 2 la cui presenza è endemica negli allevamenti italiani, con una sieroprevalenza stimata estremamente elevata (Sala *et al.*, 2000). La presenza dell'infezione non è necessariamente associata alle PCV2-related diseases. Per la diagnosi di queste ultime, a causa della elevata prevalenza dell'infezione, a fronte di una scarsa indicazione diagnostica fornita dalla sierologia o dalle tecniche di biologia molecolare per l'evidenziazione del virus (Polymerase Chain Reaction - PCR), è ritenuto indispensabile per l'iter diagnostico l'esame istologico con dimostrazione delle lesioni tipiche e della presenza del virus (proteine capsomeriche o genoma virale) nel contesto delle lesioni (Chae 2004; Ghebremariam e Gruys, 2005; Segalés *et al.*, 2005).

2.2. Materiali e Metodi

2.2.1. Casistica

In un progetto finanziato dal 2006 al 2009 da Merial Italia, sono stati individuati autonomamente da parte di diverse sezioni dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia

Romagna (IZLER) coinvolte (sezioni diagnostiche di Mantova, Lodi, Brescia, Reggio Emilia, Parma e Forlì), 64 allevamenti che avessero una anamnesi potenzialmente indicativa di PMWS rappresentata da aumento della percentuale di scarti nel post-svezzamento, sintomatologia mista prevalentemente respiratoria, ma talvolta anche enterica, a scarsa risposta alla medicazione, anche in assenza di sospetto della malattia da parte del veterinario aziendale. In ogni allevamento sono stati individuati, come campionamento minimo da eseguirsi, da 3 a 5 soggetti, con range di peso tra 10 e 40 kg. Per ciascun allevamento sono state raccolte, mediante un questionario, alcune informazioni relative a tipologia degli animali presenti, percentuali di morti, scarti ed infezioni secondarie, eventuale sospetto della presenza della PMWS in allevamento, sintomatologia e fascia di età interessata.

2.2.2. Esame anatomo-istopatologico ed immunoistochimico

Ogni soggetto è stato sottoposto a necropsia seguita da un campionamento standard di tonsilla, ileo, linfonodo inguinale superficiale, polmone, linfonodo tracheo-bronchiale. Tutti i casi sono stati sottoposti ad indagini virologiche per PRRSV ed influenza del suino e batteriologiche in base alle indicazioni necroscopiche.

Per l'esame istologico i campioni sono stati fissati in formalina e inviati al servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dell'Università degli Studi di Bologna, dove sono stati inclusi in paraffina e, da sezioni di 4 µm di spessore, sono state allestite le colorazioni ematossilina-eosina e l'indagine immunoistochimica per PCV2, quest'ultima mediante l'utilizzo di un anticorpo monoclonale specifico per PCV2 (Mab F217) gentilmente fornito dal dr. Gordon Allan (Veterinary Sciences Division, Department of Agriculture and Rural Development, Belfast, UK). Brevemente: le sezioni sono state sparaffinate e reidratate; le

perossidasi endogene sono state bloccate con perossido di idrogeno allo 0,3% in metanolo per 30'; a seguire trattamento con proteasi XIV allo 0,05% a 37°C; l'anticorpo primario è stato aggiunto alle sezioni e incubato overnight a 4°C; le sezioni sono state poi incubate con l'anticorpo secondario e successivamente con il complesso streptavidina-biotina-perossidasi (DAKO LSAB kit peroxidase); la reazione è stata evidenziata utilizzando diaminobenzidina (0,04% per 10') come cromogeno; le sezioni sono state contrastate con Ematossilina di Papanicolau, disidratate e montate con DPX.

Come controllo positivo è stato utilizzato tessuto linfonodale di suinetto affetto da PMWS spontanea, del quale era stata confermata la presenza di PCV2 con PCR e ibridazione *in situ*. Come controllo negativo sullo stesso tessuto è stato impiegato un anticorpo dello stesso isotipo dell'anticorpo primario (IgG1) ma di irrilevante specificità.

2.3. Diagnosi

Negli allevamenti, lo svezzamento rappresenta una fase critica durante la quale molti agenti patogeni sono in grado di provocare infezione o malattia. La diagnosi di PMWS deve essere affrontata in modo corretto per evitare di incorrere nell'errore di usare questo virus per mascherare oggettive incapacità di comprendere ciò che realmente sta accadendo nell'ambito dell'allevamento. L'approccio diagnostico della PMWS deve tenere conto di alcuni aspetti peculiari dell'infezione da PCV2 quali: numero molto alto di aziende e di animali infetti, sintomatologia spesso non ben definita, possibilità che i suini siano infetti da PCV2 anche in assenza di PMWS.

In molti paesi, tra cui l'Italia, viene largamente utilizzato uno schema diagnostico basato su tre condizioni fondamentali (Figura 2.1.):

1. osservazione dei segni clinici caratteristici nei gruppi di animali (deperimento, scarso

accrescimento, eventuale sintomatologia respiratoria, ecc.);

2. messa in evidenza delle lesioni microscopiche tipiche della PMWS nei tessuti linfoidei (linfonodi, tonsille, placche del Peyer);

3. dimostrazione della presenza di PCV2 nel contesto delle lesioni.

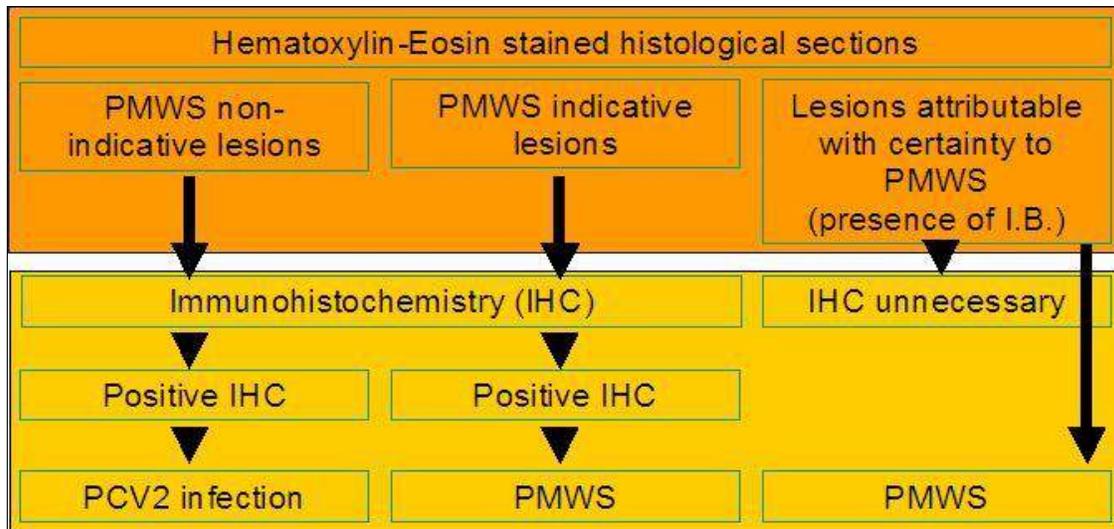


Figura 2.1. Algoritmo diagnostico per la diagnosi di PMWS (Sarli *et al.*, 2009).

Per la diagnosi di PMWS è indispensabile dimostrare la presenza del PCV2 all'interno delle lesioni tipiche. Per tale motivo, le tecniche di laboratorio normalmente impiegate per la diagnosi di altre malattie virali (metodi indiretti che mettono in evidenza la presenza di anticorpi e metodi diretti che rivelano la presenza del virus) non sono sempre appropriate.

Poiché l'infezione da PCV2 è ubiquitaria, le analisi sierologiche (ad esempio ELISA) per la ricerca degli anticorpi specifici forniscono dei risultati difficilmente interpretabili: infatti l'infezione da PCV2 non esita necessariamente nello sviluppo di PMWS e, quindi, i suini possono essere sieropositivi per PCV2, ma non necessariamente presentare la PMWS. L'utilità dei metodi sierologici sarà ulteriormente ridotta, in futuro, in tutti quei contesti aziendali in cui si deciderà di

ricorrere alla vaccinazione. Inoltre, poiché il PCV2 è responsabile anche di altre patologie (malattie associate a circovirus del suino – PCVD), l'iter diagnostico deve mirare a diagnosticare la PMWS, mentre la positività sierologica si registra in qualsiasi PCVD. Analogamente, la sola identificazione del virus in assenza di lesioni istologiche indicative di PMWS non consente di emettere una diagnosi certa. Infatti, anche in questo caso, il virus è presente sia in animali apparentemente sani sia in animali interessati da altre malattie sostenute da PCV2. La PCR, che permette la messa in evidenza di frammenti specifici di DNA virale, è attualmente una delle metodiche più diffuse per evidenziare la presenza del virus. Per quanto riguarda la diagnosi di PMWS, lo svantaggio di questa metodica consiste nel fatto che non viene contestualizzata la presenza di PCV2 all'interno delle lesioni. Il ricorso all'esame istopatologico e ad altre tecniche in grado di localizzare il PCV2 quali l'immunoistochimica (che identifica antigeni delPCV2) o l'ibridazione in situ (che identifica il DNA del virus) è dunque fondamentale per la corretta diagnosi di PMWS. Gli organi che devono essere esaminati per avere maggiori probabilità di identificare il virus e le lesioni virus-associate sono quelli linfoidi (linfonodi, tonsille, placche del Peyer dell'ileo) ed il polmone.

Anche queste metodiche diagnostiche possono però fornire risultati non facilmente interpretabili quando la sintomatologia di PMWS è associata alla presenza di lesioni di lieve entità nel tessuto linfatico e al rinvenimento di basse cariche virali.

A livello di allevamento, gli scenari interpretativi di questa situazione potrebbero essere, verosimilmente, i seguenti:

- a) è presente un'infezione subclinica da PCV2;
- b) la PMWS è in fase iniziale;
- c) gli animali, superato il momento critico della sindrome, sono in fase di guarigione.

In simili casi, oltre ad un'accurata indagine anamnestica, è opportuno esaminare il maggior numero

possibile di organi (organi linfatici: tonsille, linfonodi, ileo e milza) e più soggetti nello stesso allevamento (da 3 a 5 capi).

L'interpretazione diagnostica è stata eseguita seguendo i punti qui sotto elencati:

osservazione di sezioni colorate all'ematossilina-eosina al fine di riconoscere le lesioni tipiche di PMWS nel tessuto linfoide e nel polmone con l'obiettivo di raggiungere una delle seguenti conclusioni diagnostiche:

- a) nessuna lesione indicativa di PMWS;
- b) lesioni indicative di PMWS;
- c) lesioni sicuramente attribuibili a PMWS (solo in quei casi in cui fosse evidente la presenza delle caratteristiche inclusioni intra-citoplasmatiche (corpi inclusi).

L'osservazione all'immunoistochimica era soprattutto finalizzata a valutare la distribuzione delle cellule positive piuttosto che la quantità delle stesse. La stima era quindi perlopiù semiquantitativa delle cellule positive:

- +/- rarissime cellule positive;
- + rare cellule positive;
- ++ molte cellule positive;
- +++ moltissime cellule positive.

Conclusione diagnostica:

- conferma definitiva di PMWS in quei casi in cui la presenza di colorazione IHC + era contestuale alla presenza di lesioni indicative di PMWS in almeno un organo linfoide e/o polmone;
- lesioni non attribuibili a PMWS ma:
 - i) infezione da PCV2 nei casi dove le cellule positive per PCV2 positive per PCV2

sono presenti in assenza di lesioni indicative di PMWS;

ii) conferma di casi non PMWS e assenza di infezione da PCV2 nei casi in cui mancano lesioni da PMWS e risultano negativi all'IHC.

Questi criteri e il campionamento di una serie di organi hanno lo scopo finale di diagnosticare come PMWS solo quei casi in cui le lesioni mostrano una diffusione sistemica ed escludere così altre patologie che possano avere qualche relazione col virus PCV2.

Il protocollo diagnostico suggerito deve essere visto come supporto alla diagnosi di allevamento.

Nella Figura 2 viene riportata la probabilità di rilevare almeno un soggetto con PMWS in funzione dell'intensità di campionamento (da 1 a 10 animali estratti casualmente da una popolazione di 100 soggetti), e per valori crescenti di prevalenza (dal 20 al 40%, come riferito in letteratura), e per valori teorici di sensibilità e specificità del metodo diagnostico impiegato pari al 100%. E' evidente che la probabilità di rilevare almeno un capo positivo aumenta in maniera proporzionale alla prevalenza della malattia e al numero di soggetti esaminati. Con prevalenza attesa del 30%, il miglior compromesso tra probabilità di rilevare la malattia e costi per la diagnosi consiste nell'esame di 3-5 animali (probabilità: 66,1-83,9%). La maggiore frequenza, nei nostri dati, di gruppi con diagnosi conclusiva solo su alcuni soggetti del gruppo richiede, a nostro avviso, una particolare attenzione nei confronti del campionamento dei soggetti che verranno sottoposti a percorso diagnostico. In ogni caso occorre considerare che l'obiettivo di questa procedura è giungere a una diagnosi di allevamento. In Grafico 2.1. sono riportate le probabilità di identificare almeno un soggetto con diagnosi di PMWS confrontando 2 tipologie di campionamento (gruppi di 3 o 5 soggetti) e diverse combinazioni di risultati ottenuti (1 positivo su 3 o su 5, 2 positivi su 3 o su 5, ecc.).

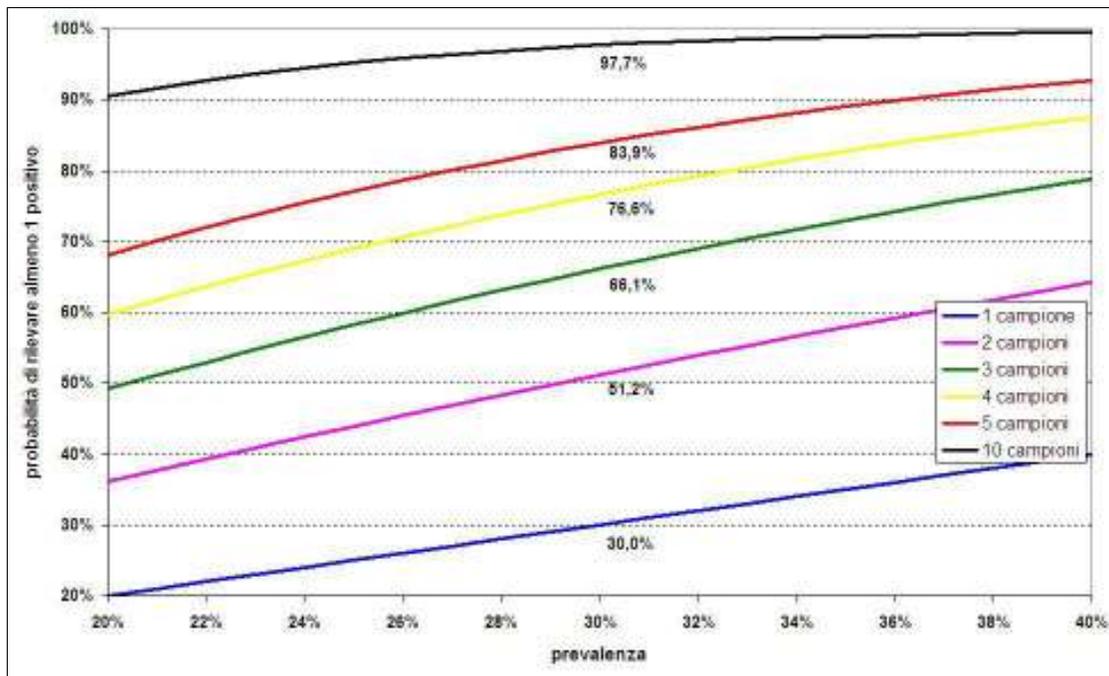


Grafico 2.1. Probabilità di rilevare almeno un soggetto positivo in funzione del numero di soggetti (campioni) esaminati e della prevalenza aziendale di PMWS.

A conferma di quanto espresso in precedenza, si evince che solo nei gruppi composti interamente da soggetti con diagnosi di PMWS (3/3 o 5/5 e quindi verosimilmente provenienti da condizioni di alta prevalenza in allevamento) la probabilità di diagnosi di PMWS non sarebbe cambiata esaminando, anziché 3 o 5, solo 1, 2 o più animali (Grafico 2.2.) Nei gruppi in cui il rapporto positivi/esaminati era inferiore (quindi verosimilmente provenienti da condizioni di prevalenza prossima alla condizione media in Italia) la probabilità di diagnosticare almeno 1 capo PMWS positivo è spesso lontana dal 100% sia con 1 che con 2 capi esaminati. Prima della verifica e della conferma di PCV2 attraverso la diagnosi istologica e l'immunoistochimica sui campioni tessutali prelevati, ad ogni azienda è stato dato un questionario anamnestico da compilare al fine di valutare il legame tra i segni clinici manifestati dagli animali affetti e i risultati ottenuti in laboratorio.

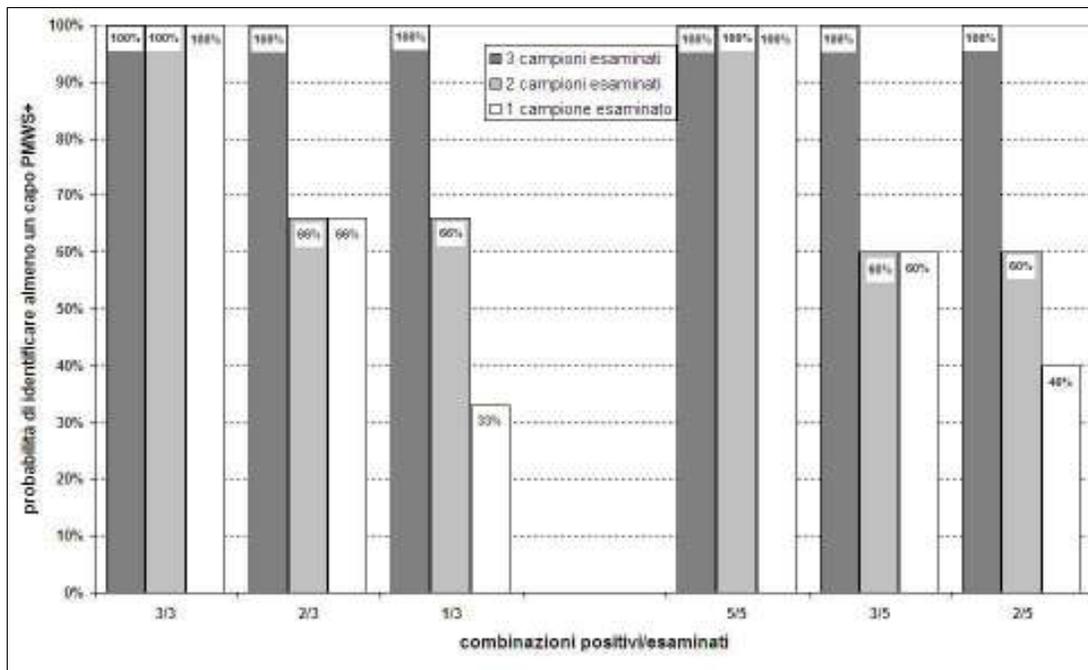


Grafico 2.2. Probabilità (calcolata dai dati raccolti) di diagnosticare la PMWS in 1 solo suino in gruppi di 3 o 5 soggetti e con diverse combinazioni di positivi per PMWS sul totale del gruppo.

Nella Tabella 2.1. si possono riassumere i dati desunti dalle risposte degli allevatori in merito. La sintomatologia più frequentemente riferita è stata quella respiratoria, seguita dal deperimento, dalla patologia intestinale e dal ridotto accrescimento. L'età di comparsa della sintomatologia riferibile a PMWS era, nella maggior parte degli allevamenti esaminati, segnalata tra le 9 e le 12 settimane, con una tendenza alla regressione dei sintomi tra le 17 e le 20 settimane. Nel 57,57% delle aziende era già stato avanzato in precedenza un sospetto di PMWS, ma la diagnosi era stata condotta esclusivamente con controllo sierologico ed evidenziazione di PCV2 mediante PCR e solo in un caso era associata all'esame istologico.

Variabile	Risultato
Composizione numerica dei gruppi esaminati	Media 3,57 (range 2-7)
Territorialità delle aziende esaminate: IZS Lombardia-Emilia Romagna	
- Brescia	6
- Mantova	16
- Lodi	15
- Reggio Emilia	10
- Parma	3
- Forlì	2
- Perugia (veterinari liberi professionisti)	6
- Bologna (Università - Facoltà di Medicina Veterinaria)	6
Diagnosi di:	
- PMWS	48 allevamenti
- infezione da PCV2	3 allevamenti
- PMWS/PCV2 negativi	13 allevamenti
Diagnosi di PMWS:	
- per la presenza di C.I.	9 casi su 48 (18,75%)
- per il completamento del percorso diagnostico (istologia+immunoistochimica)	39 casi su 48 (81,25%)
Con la diagnosi conclusiva di PMWS: presenza di tipiche lesioni agli organi linfoidi con colocalizzazione del PCV2:	
- sul gruppo	100%
- sul singolo soggetto*	25-100%
Con diagnosi conclusiva di PMWS: presenza di tipiche lesioni al polmone con colocalizzazione del PCV2:	
- sul gruppo	79%
- sul singolo soggetto*	0-100%
Diagnosi di PMWS	
- in tutti i soggetti del gruppo	21 su 48 (43,75%)
- non in tutti i soggetti del gruppo	27 su 48 (56,25%)

Tabella 2.1. Risultati dell'attività diagnostica per PMWS. *Nella casistica esaminata vengono presentate le due condizioni estreme di nessun (0%) o 1 su 4 (25%) campioni positivi, rispettivamente per polmone e tessuto linfoide, e in tutti i campioni positivi in tutti i soggetti del gruppo (100%).

2.4. Risultati

Nel periodo ottobre 2006 - gennaio 2008 sono stati esaminati 229 suini provenienti da 64 aziende del Nord e Centro Italia. Nella Tabella 2.2. sono riportati i dati della casistica esaminata ed i risultati ottenuti. La diagnosi è stata conclusiva per PMWS in 48 aziende di cui, in 30 (62,5%), è stata rilevata anche la coinfezione con il ceppo europeo del PRRSV (che complessivamente è stato messo in evidenza in 38 allevamenti, dei quali 10 senza diagnosi di PMWS). In 18 aziende invece la diagnosi di PMWS non era associata all'infezione da PRRSV. In un solo caso sono stati messi in evidenza in sede polmonare i virus influenzali del suino. L'isolamento di batteri, nei casi con diagnosi conclusiva di PMWS, era più frequente in concomitanza dell'infezione con PRRSV. I microrganismi isolati sono stati in ordine di frequenza decrescente *Pasteurella multocida*, *Streptococcus* spp., *Salmonella* var., *Staphylococcus* spp., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Actinomyces pyogenes*.

Variabili	Ultimo anno (% allevamenti)			Ultimi 5 anni (% allevamenti)		
	↓	=	↑	↓	=	↑
Mortalità allo svezzamento	13,3	43,3	43,3	15	30	55
Scarti allo svezzamento	14,8	18,5	66,7	25	12,5	62,5
Ispezioni secondarie	11,1	18,5	70,4	15	20	65
Consumo di antibiotici	3	18,2	78,8	0	11,1	88,9

Tabella 2.2. Percentuale di aziende che hanno giudicato i parametri elencati diminuiti (↓), invariati (=) o in aumento (↑) nei due periodi di tempo considerati.

2.4.1. Esame necroscopico

L'esame necroscopico ha messo in evidenza polisierosite con flogosi sierofibrinosa da sub-acuta a cronica con sinechie fibrose a livello peritoneale, pleurico e pericardico (Figura 2.2.).



Figura 2.2. Suino. Polisierosite con flogosi sierofibrinosa da sub-acuta a cronica. a: Peritonite sierofibrinosa acuta. Liquido giallo-opaco contenente fiocchi di fibrina che tendono ad aderire alle anse intestinali. b: Pericardite fibrinosa sub-acuta. Un panno di fibrina ricopre la superficie epicardica, con ispessimento del pericardio c: Pleurite cronica fibrosa. Sono evidenti numerose sinechie fibrose pleuro-parietali; d: Cuore. Pericardite cronica fibrosa con sinechie epi-pericardiche.

Più raramente la flogosi assumeva un carattere nettamente fibrino-purulento. I tessuti linfoidi, solo limitatamente al linfonodo inguinale superficiale, mostravano talvolta moderata iperplasia con lieve edema del tessuto adiposo perilinfonodale. Il polmone mostrava costantemente un aumento di consistenza associato ad un colore da rosso-bruno a grigiastro delle parti dorsali dei lobi basilari e con superficie di sezione asciutta riferibile ad una polmonite interstiziale, mentre era presente una polmonite essudativa da sub-acuta a cronica nelle parti cranioventrali riferibile a broncopolmonite o, talvolta, a polmonite enzootica.

2.4.2. Istologia del tessuto linfoide

Nei casi con lesioni indicative di PMWS, l'esame istologico ha messo in evidenza vario grado di

deplezione cellulare caratterizzata da ipotrofia-atrofia dei follicoli con, non costante, presenza di cellule epitelioidi o giganti centro follicolari (Figura 2.3.). Nelle lesioni di deplezione linfoide di grado 1 i follicoli erano ancora apparenti, seppure ipotrofici, ed associati a rarefazione linfocitaria del tessuto linfoide interfollicolare.

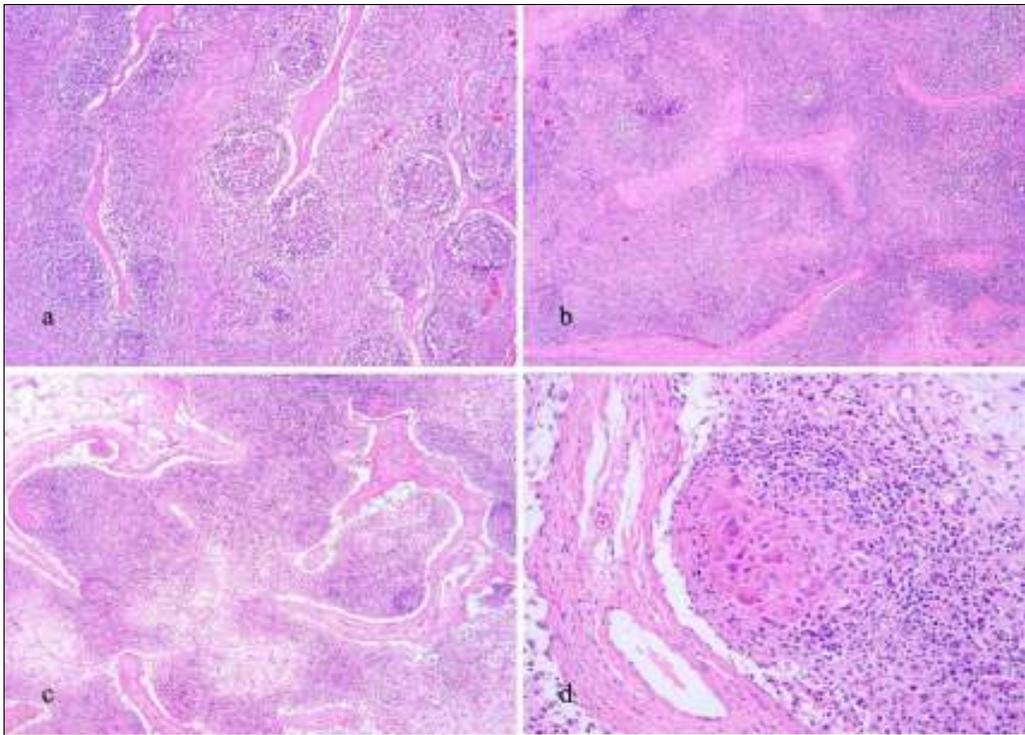


Figura 2.3. Suino, linfonodo inguinale superficiale. a: aspetto istologico normale. Presenza di follicoli linfatici e tessuto interfollicolare, E&E, 5x; b: PMWS, grave deplezione linfoide con scomparsa dei follicoli e rarefazione cellulare del tessuto interfollicolare, E&E, 5x; c: PMWS, granulomi epitelioidi centrati su follicoli e rarefazione cellulare del tessuto interfollicolare, E&E, 5x; d: PMWS, particolare dell'immagine precedente: granuloma epitelioido centrofollicolare, E&E, 20x.

La progressione della deplezione linfocitaria (grado 2) era caratterizzata dalla scomparsa dei follicoli e dalla presenza del solo tessuto linfatico interfollicolare ulteriormente depleto di linfociti eventualmente associato, in alcuni casi, alla presenza di cellule epitelioidi o giganti a livello di seni linfonodali peritrabecolari o in lesioni nodulari (linfadenite granulomatosa) (Figura 2.5.c, d) verosimilmente centrate sui preesistenti follicoli. Nella deplezione linfoide grave (grado 3) si registravano assenza di follicoli e grave perdita di linfociti nel tessuto interfollicolare che appariva

popolato solo da una componente cellulare stromale o istiocitaria associata a tessuto simil-midollare nettamente prevalente come estensione rispetto a quello linfoide.

In 3 casi, nei linfonodi inguinali superficiali, alla deplezione linfocitaria era associata la presenza di focolai di linfadenite apostematosa, mentre nelle tonsille alla deplezione linfocitaria (Figura 2.4.) era associata la presenza di colonie batteriche nelle cripte e, in 4 casi, focolai di tonsillite purulenta.

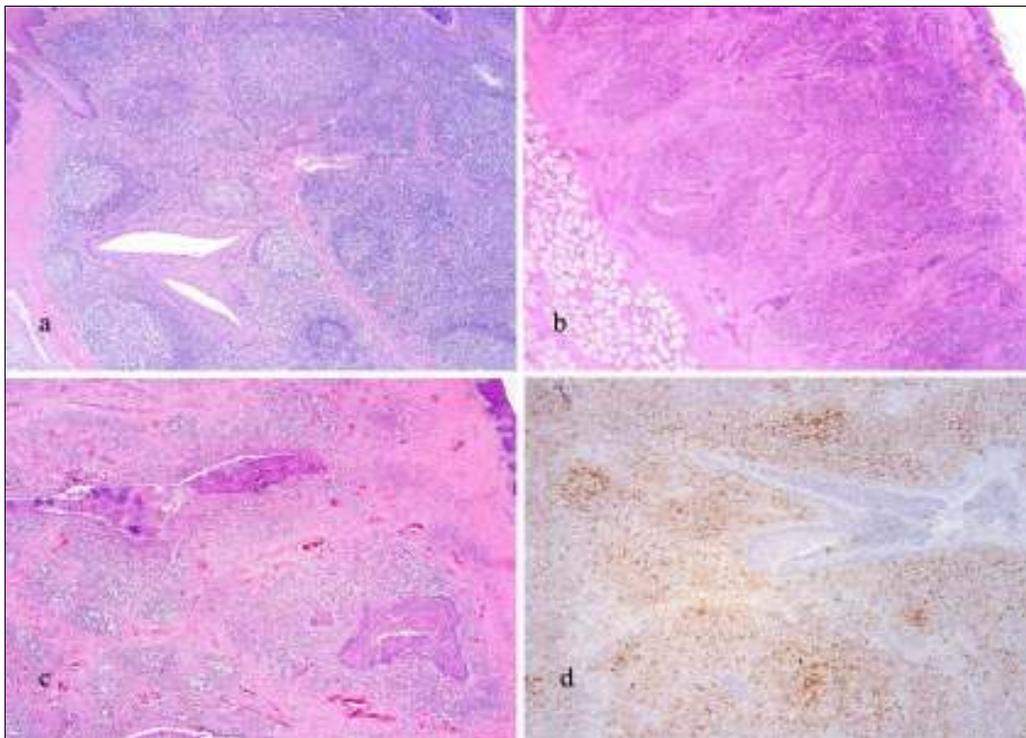


Figura 2.4. Suino, tonsilla a: aspetto istologico normale. Presenza di follicoli linfatici e tessuto interfollicolare, E&E, 5x; b: PMWS, moderata deplezione linfoide con scomparsa dei follicoli e rarefazione cellulare del tessuto interfollicolare, E&E, 5x; c: PMWS, grave deplezione linfoide con scomparsa dei follicoli e grave rarefazione cellulare del tessuto interfollicolare. E&E, 5x; d: PMWS reazione immunohistochimica per PCV2, positività diffusa associata a deplezione linfocitaria, 5x.20x

Nell'ileo la deplezione linfocitaria del tessuto linfatico era apprezzabile con ipotrofia, perdita della polarità follicolare, rarefazione cellulare e granulomi centrolinforari (Figura 2.5.).

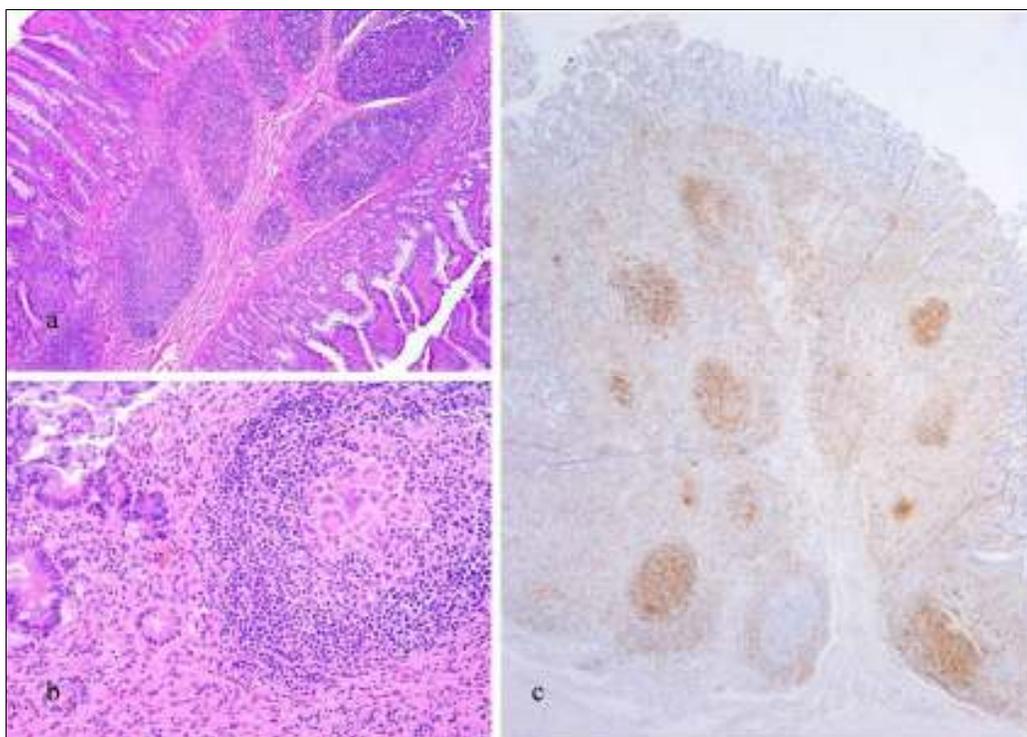


Figura 2.5. Suino, ileo a: aspetto istologico normale. Presenza di voluminosi follicoli linfatici, E&E, 5x; b: PMWS, granuloma epitelioido centrato sul follicolo, E&E, 20x; c: reazione immunoistochimica per PCV2; positività prevalentemente follicolare.

Alle lesioni già citate, nei casi con sicura indicazione di PMWS già all'esame istologico con ematossilina-eosina, erano presenti nel citoplasma di macrofagi, i caratteristici corpi inclusi citoplasmatici, anfofilici di 2-15 micron di diametro, singoli o più spesso riuniti a grappolo (Figura 2.6.). L'indagine immunoistochimica ha messo in evidenza colorazione sia citoplasmatica che nucleare in cellule dendritiche centrofollicolari, mentre solo citoplasmatica in cellule istiocitarie del tessuto interfollicolare e simil-midollare (Figura 2.7., d e c) ed incostantemente nelle cellule epitelioidi e giganti centrofollicolari, sinusali (Figura 2.7.c, d) o dei granulomi della linfadenite granulomatosa. Nelle lesioni di grado 1 l'espressione più costante di positività si registrava nelle cellule follicolari dendritiche poi, parallelamente all'aumento del grado di deplezione (gradi 2 e 3), si assisteva ad una estensione della positività anche a cellule extrafollicolari. Globalmente all'aumentare del grado di deplezione si assisteva ad un aumento della quantità di cellule positive.

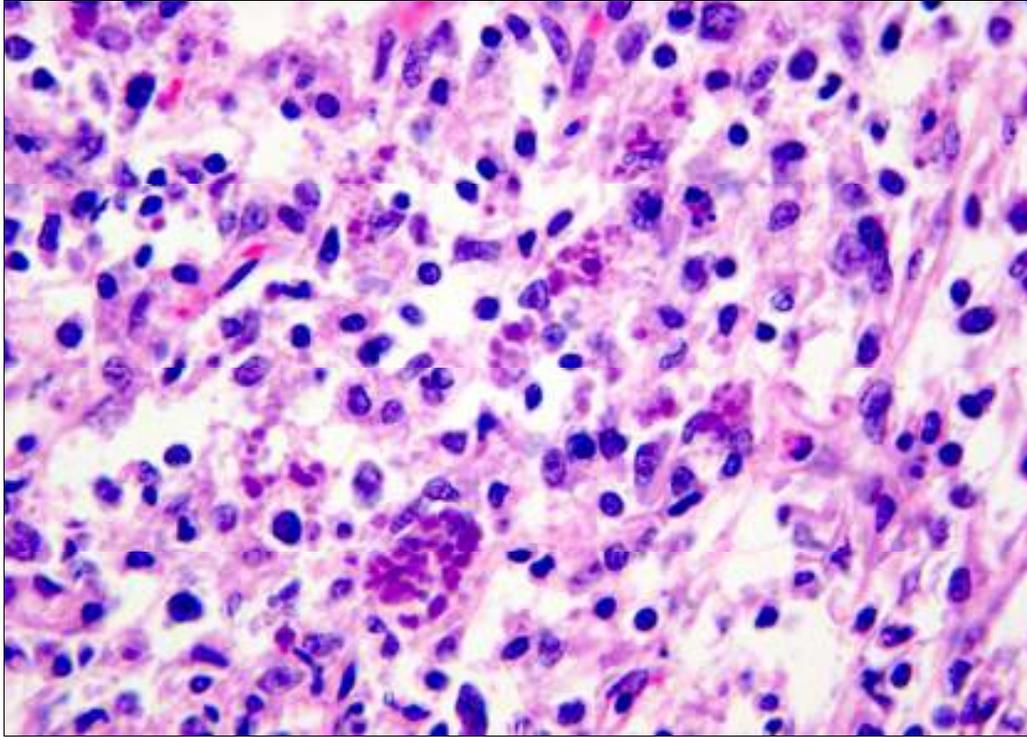


Figura 2.6. Suino. PMWS. Linfonodo tracheobronchiale. Presenza dei tipici corpi inclusi apprezzabili come formazioni rotondeggianti, anfofiliche, di 2-15 micron di diametro, riuniti a grappolo, nel citoplasma di macrofagi. E&E, 63x.

Nella Tabella 2.1. sono riportate le percentuali di casi con deplezione linfoide associata a positività immunohistochimica per PCV2 riferiti al gruppo (allevamento) o al singolo soggetto.

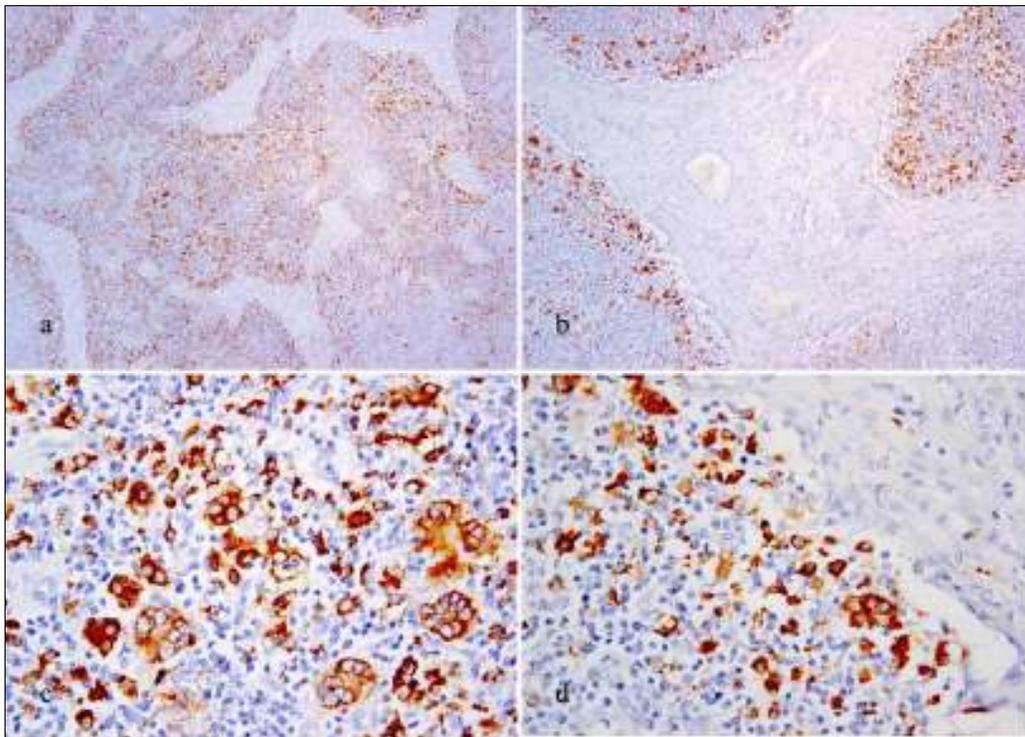


Figura 2.7. Suino. Linfonodo inguinale superficiale. PMWS. Reazione immunohistochimica per PCV2. Positività citoplasmatica per PCV2 nel tessuto linfoide depleto, distribuita in maniera diffusa (a, 10x e particolare in c, 40x) o concentrata in macrofagi nei seni peritrabecolari (b, 10x e particolare in d, 40x).

2.4.3. Istopatologia del polmone

Nel polmone era presente una flogosi mista, sia interstiziale che essudativa, nei campioni di 31 su 64 allevamenti e solo interstiziale in 17 allevamenti. La polmonite interstiziale, che mostrava estensione variabile, da focale, a multifocale confluyente, a diffusa, era caratterizzata dall'accumulo prevalentemente alveolo-settale, ma anche peribroncovascolare, di macrofagi e linfociti (Figura 8a, b). I setti alveolari apparivano ispessiti e le cavità alveolari irregolari, talvolta mostranti iperplasia degli pneumociti di II tipo (epitelizzazione alveolare). Non erano infrequenti casi di alveolite macrofagica (Figura 2.8.a) con numerosi macrofagi essudati nel lume degli alveoli a distribuzione lobulare focale. Solo in 2 casi era apprezzabile una flogosi granulomatosa (Figura 2.8.c). In 24 casi era rilevabile polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP), caratterizzata da intensa iperplasia degli pneumociti alveolari e necrosi dell'essudato (macrofagi) presenti sia nell'infiltrato alveolo-

settale che nei lumi alveolari. In 8 casi, la PNP era associata a polmonite interstiziale ed in 17 concomitante ad una polmonite essudativa. La componente essudativa della flogosi polmonare era riconducibile ad una broncopolmonite o, più raramente, ad una componente fibrinosa alveolare mista ad essudato cellulare rappresentato da macrofagi e granulociti. L'indagine immunohistochimica ha messo in evidenza positività per PCV2 nei campioni di polmone di 38 allevamenti dei 48 con PMWS. La positività era rilevabile nei campi di polmonite interstiziale in cui erano presenti macrofagi con colorazione marrone del citoplasma sia nell'infiltrato alveolo-settale (Figura 2.8.d) che negli alveoli. Macrofagi e linfociti positivi per PCV2 erano anche presenti nell'infiltrato peribroncovascolare (Figura 2.8.d). In 3 casi su 8 di PNP era rilevabile positività per PCV2. Nella Tabella 1 sono riportate le percentuali di casi con polmonite interstiziale associata a positività immunohistochimica per PCV2 riferiti al gruppo (allevamento) o ai singoli soggetti.

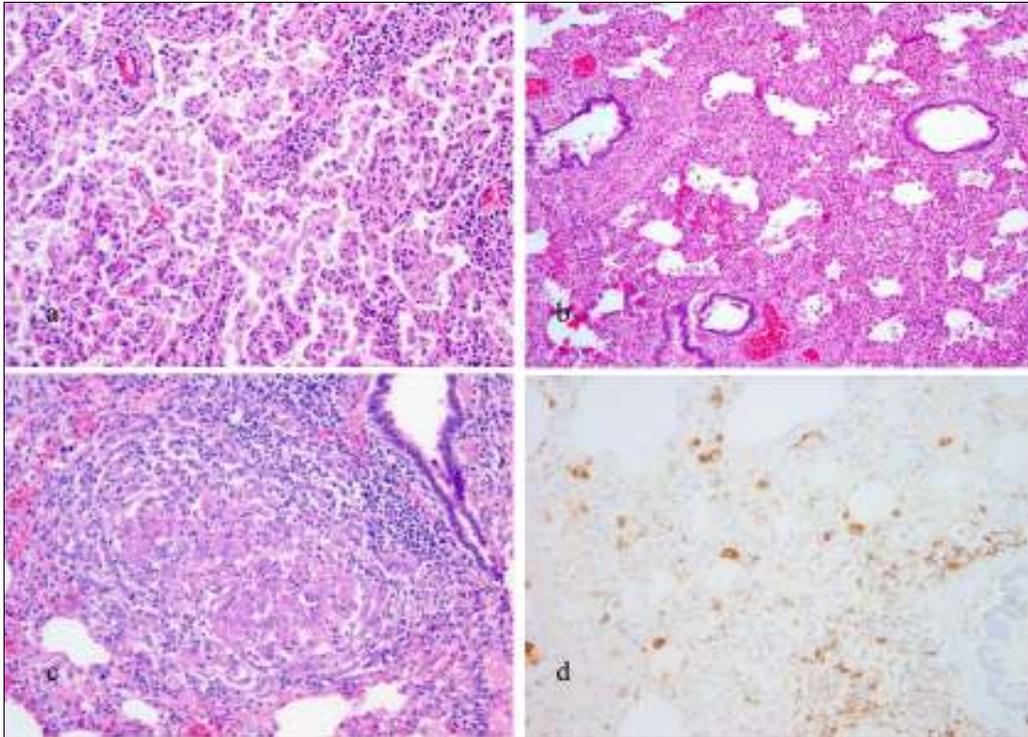


Figura 2.8. Suino, polmone. a: PMWS, moderata polmonite interstiziale e alveolite desquamativa, E&E, 20x; b: PMWS, grave e diffusa polmonite interstiziale alveolo-settale. Ispessimento dei setti alveolari per infiltrazione di linfociti e macrofagi, E&E, 10x; c: PMWS, granuloma peribronchiolare costituito da cellule epitelioidi, E&E, 20x; d: PMWS, reazione immunoistochimica positiva per PCV2 nel citoplasma di macrofagi dell'infiltrato infiammatorio peribronchiolare ed alveolo-settale, 20x.

2.5. Discussione

Nel nostro Paese, sono relativamente scarse le segnalazioni relative alla presenza e circolazione del PCV2 (Sala *et al.*, 2000; Marruchella *et al.*, 2001; Corradi *et al.*, 2004; Verin *et al.*, 2004; Opriessnig *et al.*, 2007; Chiou *et al.*, 2010; Poljak *et al.*, 2011) e alla diagnosi di PMWS, dimostrata mediante evidenza istologica delle lesioni con colocalizzazione dell'agente eziologico (Marcato *et al.*, 1999; Martelli *et al.*, 2000; Mandrioli *et al.*, 2003; Fiorentini *et al.*, 2004; Luppi *et al.*, 2004; Finlaison *et al.*, 2007; Belskei *et al.*, 2010) in allevamenti italiani. Poiché l'infezione da PCV2 è endemica negli allevamenti italiani (Sala *et al.*, 2000), è consolidato che l'indagine sierologica o le

moderne indagini di biologia molecolare non possono essere considerate risolutive nella diagnosi di PMWS in assenza di un riscontro istopatologico (Ghebremariam e Gruys, 2005) che testimoni la presenza delle tipiche lesioni negli organi bersaglio: deplezione linfocitaria eventualmente associata a linfadenite granulomatosa con possibili flogosi interstiziali da linfocitarie a granulomatose in diversi parenchimi (Chae 2004; Segalés *et al.*, 2004, 2005). Dall'esame dei questionari anamnestici aziendali emerge spesso un approccio diagnostico errato basato esclusivamente sull'impiego della sierologia e/o della ricerca del genoma virale mediante PCR; in 1 solo caso la diagnosi era stata ottenuta mediante esame istologico, ma non compariva la dimostrazione della presenza del PCV2. L'approccio diagnostico esclusivamente di tipo microbiologico non consente, infatti, di associare con certezza la presenza di PCV2 a sintomi eventualmente riferibili a PMWS. Analogamente, l'esame necroscopico può risultare indicativo ma non conclusivo per la diagnosi di PMWS, poiché da esso emerge un quadro di flogosi condizionato dalle complicanze batteriche (Segalés *et al.*, 2005). Per tali ragioni, si è deciso, di ricorrere all'indagine istopatologica, come peraltro applicato nei protocolli diagnostici desumibili dalla letteratura (Chae, 2004; Ghebremariam e Gruys, 2005; Segalés *et al.*, 2005). L'esame necroscopico è risultato indicativo ma non conclusivo per la diagnosi di PMWS, poiché da esso emergeva un quadro di flogosi condizionato dalle complicanze batteriche, come già noto per la PMWS (Segalés *et al.*, 2005). Il PCV2 è oggi considerato la base eziologica di diverse entità patologiche fra loro molto diverse nella patogenesi e nella tipologia di lesioni, come per esempio la PDNS e PMWS, mentre altre volte esiste una forte somiglianza istologica nella tipologia di lesioni presenti in cui le diverse malattie si diversificano solo per la sistemicità (PMWS) o la localizzazione ai soli linfonodi (linfadenite necrotizzante) o all'intestino (enterite granulomatosa) (Chae, 2005). La modalità di campionamento pianificato ha permesso di individuare la tipologia di lesioni presenti e la loro distribuzione tra i diversi tessuti linfoidi

esaminati e nel polmone, ciò con la finalità di inquadrare tra i casi di PMWS solo quelli con una diffusione sistemica delle lesioni ed escludere le altre PCV2-related diseases. Oltre all'esame di più organi per la diagnosi di PMWS, fondamentale è stato il ricorso ad un campionamento di gruppo, poiché è noto che all'infezione da PCV2 solo una parte (dal 4 al 30% con punte massime fino al 60%) di soggetti sviluppa la PMWS (Segalés *et al.*, 2005) che deve quindi essere affrontata nell'iter diagnostico sul gruppo e non sul singolo soggetto. Dall'esame della territorialità (Tabella 2.1.), che non vuole riflettere la frequenza di distribuzione nelle singole aree ma solo la presenza, la PMWS si può considerare diffusa sia nel Nord che nel Centro Italia. L'approccio diagnostico non è stato condotto scegliendo casualmente le aziende, ma individuandole tra quelle con un'anamnesi aziendale indicativa della possibile presenza di PMWS (aumento della percentuale di scarti nel post-svezzamento, sintomatologia mista prevalentemente respiratoria, ma talvolta anche enterica, e scarsa risposta alla medicazione). La presenza di tale condizione anamnestica è risultata associata a PMWS in 48 delle 64 aziende esaminate. In 3 allevamenti, invece, l'assenza di lesioni istologiche associate a positività immunostochimica per PCV2 ha permesso di evidenziare solo una infezione da PCV2. Poiché il virus è endemico nelle popolazioni suine, è facile in alcuni soggetti potere dimostrare l'infezione (presenza del virus) con metodica immunostochimica, ma non si vuole assolutamente sostenere la necessità di questo esame per dimostrarla, in quanto, più sensibili sono l'esame sierologico o la PCR che, invece, non potendo dimostrare la presenza delle lesioni, non hanno un ruolo fattivo nella diagnosi della malattia (PMWS). I dati ottenuti confermano che le tecniche più sensibili per la dimostrazione della presenza del virus sono l'esame immunostochimico o ibridazione *in situ* (Chae, 2004; Ghebremariam e Gruys, 2005; Segalés *et al.*, 2005), poiché la possibilità di evidenziare i corpi inclusi virali è un'evenienza poco frequente (9 su 48 diagnosi conclusive di PMWS, 18,75%). Pertanto il percorso diagnostico non dovrebbe mai

considerarsi conclusivo con il solo esame istologico mediante colorazione con ematossilina-eosina. Le lesioni anatomopatologiche in corso di PMWS vengono generalmente considerate peculiari: ciò può essere vero per il tessuto linfoide ma non per il polmone in cui PRRSV può essere responsabile di quadri patologici molto simili. Nel tessuto linfoide, però, quadri di deplezione cellulare lieve, come spesso sono occorsi nella casistica esaminata, hanno scarso valore diagnostico se non abbinati alla presenza del PCV2. È quindi indispensabile, se non si ha evidenza dei corpi inclusi, il ricorso alle sopraccitate indagini per evidenziare il virus, sia nelle lesioni dei tessuti linfoidi che polmonari. Tra il tessuto linfoide ed il polmone, il primo è risultato, come noto dalla letteratura, offrire le maggiori indicazioni diagnostiche, sia perché il tipo di lesione è peculiare e non riscontrabile in altre patologie sia perché, nel caso di presenza delle lesioni, nel 100% dei casi (riferiti alla diagnosi sul gruppo) esso ha rivelato la positività immunohistochimica per il PCV2. Ciò non si è riscontrato nella lesione polmonare in cui, a fronte della presenza della polmonite interstiziale nel 100% dei casi con PMWS, sono risultati positivi all'indagine immunohistochimica solo il 65% dei casi. È nota la sovrapposizione di aspetto istologico del quadro polmonare in corso di PMWS e di infezione da PRRSV che, stante l'elevata frequenza di casi con coinfezione PCV2/PRRSV riscontrati, è da ritenere la causa di polmonite interstiziale in assenza di reazione immunohistochimica positiva per PCV2. L'intero set di organi deve quindi essere campionato e non si dovrebbe limitare, per la diagnosi di PMWS, il campionamento al solo polmone, anche nel caso di episodi con sintomatologia clinica prevalente solo di tipo respiratorio. Sia l'ibridazione *in situ* che l'immunohistochimica, evidenzianti rispettivamente il genoma o gli antigeni dei capsomeri del PCV2, sono annoverate in letteratura tra le metodiche da utilizzare per dimostrare la colocalizzazione lesioni-virus nella diagnosi di PMWS (Chae 2004; Ghebremariam e Gruys, 2005; Segalés *et al.*, 2005). Dal presente lavoro si conferma per lo scopo l'indagine immunohistochimica

che, rispetto all'ibridazione *in situ*, risulta più agevole ed applicabile anche in laboratori non dotati di tecnologia per *in situ*. Dai risultati della presente indagine è emersa una elevata frequenza di associazione dell'infezione da PRRSV in corso di PMWS. Ciò conferma quanto già emerso in altri paesi (Ellis *et al.*, 2004; Wellenberg *et al.*, 2004; Segalés *et al.*, 2005) e troverebbe spiegazione nel verosimile ruolo di attivazione dei macrofagi svolto da PRRSV che crea condizioni permissive sulla replicazione del PCV2 nelle stesse cellule (Krakowka *et al.*, 2001). Anche dai risultati della nostra indagine emergerebbe quindi che un ottimo strumento di profilassi della PMWS sia rappresentato dal controllo delle altre infezioni virali presenti in allevamento che, insieme ai fattori ambientali (Ghebremariam e Gruys, 2005) e genetici (Opriessnig *et al.*, 2006), possono avere un ruolo nella patogenesi della malattia. In più del 50% delle aziende con diagnosi conclusiva di PMWS, il percorso diagnostico ha messo in evidenza la malattia solo in alcuni soggetti del gruppo esaminato. Dati recenti (Alborali e Morvan, 2006) stimano una prevalenza attuale della malattia tra il 5 ed il 20%, in calo rispetto al passato, quando, con decorso acuto, era stimata tra il 20 ed il 40%. Viene quindi confermato l'attuale carattere endemico della malattia negli allevamenti italiani. Considerando la probabilità teorica di avere almeno 1 soggetto con diagnosi di PMWS (Figura 2.2.) in funzione della prevalenza aziendale e dell'intensità di campionamento e la probabilità calcolata sui dati ottenuti (Figura 2.3.), è evidente che il metodo diagnostico impiegato appare più efficace quando applicato su un gruppo di animali piuttosto che sul singolo soggetto. A supporto di questa considerazione deve anche essere riferito il risultato della probabilità di evidenziare il PCV2 nel contesto delle lesioni istologiche che, seppure maggiori per il tessuto linfoide rispetto al polmone, per entrambi i tipi di tessuto è ridotta se valutata sul singolo soggetto rispetto alla stessa analisi vista sul gruppo (Tabella 2.1.).

2.6. Conclusioni

La pianificazione del lavoro, che ha previsto il campionamento in un gruppo di animali e di organi bersaglio, ha permesso di confermare, secondo quanto già applicato in altri paesi, la diffusione della PMWS in allevamenti del Nord e Centro Italia. In considerazione del fatto che la prevalenza di PMWS negli allevamenti italiani si è verosimilmente ridotta nel corso degli anni, il migliore compromesso tra la probabilità di diagnosi e i costi degli esami, si ottiene esaminando un gruppo di 3-5 animali mediante il ricorso all'esame istologico con dimostrazione della presenza del PCV2 nelle tipiche lesioni della malattia; ciò in un insieme di organi bersaglio che dovrebbero comprendere più stazioni di tessuto linfoide ed il polmone.

Produzione scientifica originale

- Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G. (2008) Diagnosi di PMWS in Italia: risultati di 18 mesi di attività. Atti XXXIV Meeting SIPAS (Società Italiana Patologia e Allevamento Suini), Modena, 13-14 marzo.
- Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2008) Diagnosis of PMWS in Italy: application of an histological/immunohistochemical tool on a group based sampling. Proceedings XXXIV IPVS Congress, 22-26 June 2008, Durban (South Africa).
- Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G. (2008) Diagnosi di PMWS in Italia. Large Animals Review, 14: 119-126.
- Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Gnudi M., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2009) Application of a protocol for the diagnosis of PMWS in Italy. Vet Rec, 164: 519-523.

CAPITOLO 3: Il ruolo di PCV2 nella Polmonite Proliferativa e Necrotizzante del suino

3.1. Introduzione

La polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) è stata descritta per la prima volta in Canada nel 1990 (Morin *et al.*, 1990) come una patologia del suino in svezzamento e post-svezzamento. La PNP è oggi inserita fra le “malattie da circovirus” (PCVD) del suino.

Le lesioni riscontrate nei polmoni dei suini affetti risultano diverse da quelle normalmente osservate nella patologia respiratoria suina comune. Questo tipo di affezione già allora rappresentava un nuovo e importante problema di sanità pubblica (Austin *et al.*, 1991). I suini colpiti appartengono a diverse fasce di età, generalmente dai 15 giorni ai 4 mesi di età, con un picco tra le 4 e le 10 settimane. Morbilità e mortalità sono di variabile entità. I principali segni clinici rilevati sono febbre, dispnea e difficoltà respiratoria di vario grado e genere. La maggior parte dei sopravvissuti alla malattia mostra un ritardo della crescita e grave deperimento corporeo. I suini adulti, specialmente, non manifestano problemi respiratori di evidenza clinica (Morin *et al.*, 1990).

Le lesioni macroscopiche variano a seconda delle fasi della malattia. Frequentemente è apprezzabile il consolidamento focalmente estensivo dei lobi craniale e medio insieme al lobo accessorio e alla metà inferiore dei lobi caudali. È osservabile, inoltre, una distribuzione lobulare delle lesioni nella metà dorsale dei lobi caudali. In molti casi tale consolidamento interessa la totalità del polmone.

I lobi non appaiono collassati, sono di colore rosso o grigio (aspetto a carne di pesce), non sono umidi e la consistenza è carnea. Un reperto comune è l'edema interlobulare. In molti casi, entrambi i polmoni sono aumentati di volume e mostrano una colorazione rossa o grigia e una consistenza

gommosa. Al taglio, il parenchima polmonare protrude, è asciutto e l'aspetto ricorda quello del timo. Queste caratteristiche sono più evidenti nei lobi caudali. Lesioni di broncopolmonite purulenta, invece, si riscontrano comunemente nelle porzioni polmonari cranio-ventrali. Una pleurite fibrinosa più o meno estesa è un altro aspetto macroscopico tipico del quadro lesionale e comunemente repertato. I linfonodi mediastinici e bronchiali sono aumentati di dimensioni ed emorragici. Alcuni suini sono affetti da dilatazione ventricolare destra con associata evidente insufficienza cardiaca e congestione epatica (Morin *et al.*, 1990).

Dal punto di vista istologico, sono compresenti quadri di essudazione e di proliferazione. Le lesioni essudative si evidenziano per l'osservazione di alveoli a contenuto edematoso ricco in proteine e grandi macrofagi. Sono a volte presenti cellule giganti sinciziali. Le lesioni proliferative sono invece caratterizzate da una proliferazione marcata dei pneumociti di II tipo (“epitelizzazione polmonare”), grandi cellule cuboidali che bordano la parete alveolare. Molti di questi pneumociti, infatti, sono aumentati in dimensioni e il citoplasma è vacuolizzato. In molti polmoni con “epitelizzazione” è stata osservata una significativa fibrosi interstiziale (Morin *et al.*, 1990).

Nelle prime fasi della malattia non è raro riscontrare una sovrapposizione di molteplici lesioni; con lo svilupparsi della stessa patologia, predominano aspetti di proliferazione epiteliale. A questo stadio si nota un'infiltrazione da leggera a moderata di cellule mononucleate nei setti alveolari. In tutte le fasi della malattia, sono spesso visibili nel lume dei dotti alveolari e negli alveoli precipitati di fibrina e membrane ialine. Un'altra lesione tipica in questi casi è la presenza di cellule necrotiche, probabilmente macrofagi, nei lumi alveolari. Queste cellule hanno nuclei picnotici e un citoplasma eosinofilo coartato. Oltre alle lesioni alveolari, alcuni soggetti mostrano aspetti di bronchiolite necrotizzante che interessa soprattutto i piccoli bronchioli. Queste lesioni sono caratterizzate da necrosi estesa dell'epitelio bronchiolare con desquamazione nel lume e minimo, o addirittura assente, infiltrato cellulare peribronchiolare di mononucleati. Nella fase proliferativa l'epitelio bronchiolare è iperplastico e in alcuni casi è presente un'infiltrazione cellulare peri-bronco-

vascolare di mononucleati, da leggera a moderata. Nei casi più gravi, le lesioni di broncopolmonite purulenta sono associate a presenza di essudato catarrale e aspetti proliferativi nelle porzioni cranio-ventrali dei polmoni.

Gli esami batteriologici di routine rivelano la presenza di batteri come *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* o *Streptococcus suis* di tipo 2 nelle lesioni di broncopolmonite purulenta.

Pneumocystis carinii è spesso presente e non raramente in considerevole entità; l'infezione produce essudato schiumoso e dall'aspetto tipico a nido d'ape (Morin *et al.*, 1990).

La natura contagiosa della malattia nelle nidiate affette (spesso la patologia inizia a manifestarsi con l'introduzione di nuovi animali) e le lesioni osservate portano a considerare come causa più probabile quella virale. Virus diversi possono provocare la stessa lesione di bronchiolite necrotizzante e un danno alveolare diffuso nell'uomo. I più conosciuti sono il virus respiratorio sinciziale, l'influenza A, il Morbillivirus, il virus della varicella e il Cytomegalovirus. In molti casi, infezioni batteriche secondarie complicano il quadro clinico e anatomopatologico.

L'eziologia di questa entità patologica, quindi, non è ancora ben chiara. Nei tardi anni '80, l'identificazione della PNP avviene simultaneamente all'emergenza di una nuova patologia nella patologia suina, chiamata a quel tempo “mystery swine disease” e adesso conosciuta come Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina (PRSS) (Collins *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1993). Questa è provocata dal virus PRRS, un virus a RNA isolato in origine nei Paesi Bassi e classificato come un Arterivirus appartenente alla famiglia Arteriviridae. Le lesioni della PNP sono state originariamente attribuite da un gruppo di studio canadese a un nuovo ceppo del virus dell'influenza suina tipo A (H3N2 e H1N1) (Morin *et al.*, 1990; Austin e Bystrom, 1991; Dea *et al.*, 1992; Girard *et al.*, 1992). Successivamente PRRSV è stato ripetutamente isolato in polmoni con lesioni di polmonite proliferativa e necrotizzante in assenza del virus influenzale. Trasmissioni sperimentali con diversi di questi isolati di PRRSV hanno causato lesioni polmonari simili a quelle osservate in condizioni di campo, anche se più lievi. L'associazione frequente di PRRSV e lesioni da PNP e il

raro coinvolgimento del virus influenzale è stata confermata da studi immunocistochimici su casi di polmonite proliferativa e necrotizzante di casi spontanei raccolti fra il 1988 e il 1993. Nel 1994 Laroche et al. hanno ipotizzato che le lesioni della PNP fossero causate dal PRRSV dimostrando in 28 polmoni su 38 la presenza di quest'ultimo ed in uno solo caso la presenza di SIV, mentre in 9 polmoni non è stato evidenziato nessun agente eziologico conosciuto. Nelle infezioni spontanee da PRRSV si riscontra un ampio spettro di lesioni polmonari osservabili. Queste possono variare da una leggera e non ben specificata polmonite interstiziale e proliferativa multifocale a una grave e ben definita lesione polmonare di infiammazione tipicamente proliferativa e necrotizzante.

Le differenze patogenetiche tra gli isolati di PRRSV sono state riportate e possono spiegare la gravità variabile della patologia riscontrata in campo. Successivamente, gli stessi Autori americani (Drolet *et al.*, 2003) ed Europei (Pesch *et al.*, 2000; Grau-Roma e Segalés, 2007) hanno evidenziato una frequente coesistenza di due virus (PRRSV e PCV2) in polmoni con PNP. Tuttavia, i risultati ottenuti da Autori americani ed Europei hanno mostrato qualche differenza. I primi hanno evidenziato costantemente, in corso di PNP, il PRRSV, che nel 42% dei casi era co-presente con PCV2 e mai quest'ultimo come solo agente eziologico. Gli altri (Grau-Roma e Segalés, 2007) hanno descritto in un totale di 74 casi di PNP la presenza del solo PCV2 in 29 casi, l'associazione PCV2-SIV in 3, la co-presenza PCV2-ADV (Aujeszky's disease virus) in un solo caso, PCV2-PRRSV in 30 ed il solo PRRSV in 3 casi. D'altra parte in entrambi gli studi in una certa percentuale di polmoni con PNP (rispettivamente il 7 ed il 10%) non è stata rilevata la presenza di nessun agente eziologico tra quelli indagati. Perciò tali risultati, oltre ad evidenziare un comportamento ed un ruolo diverso dei virus considerati nell'insorgenza della PNP nei due differenti contesti continentali, lasciano ancora molti spazi di approfondimento e di studio.

A tale scopo, nell'ambito di un progetto promosso da Merial Italia che opera dal giugno del 2006 per l'applicazione di un protocollo per la diagnosi della PMWS (post-weaning multisystemic wasting syndrome) in allevamenti del nord e centro Italia sono stati selezionati, da 217 suini, 24

polmoni con PNP. I polmoni in oggetto sono stati sottoposti ad un'indagine immunohistochimica oltre che per PCV2 anche per PRRSV in modo da raccogliere dati preliminari utili a verificare l'eventuale ruolo di questi due virus nella eziologia della PNP negli allevamenti italiani.

3.2. Materiali e Metodi

La revisione delle lesioni riscontrate nei polmoni di 217 suini campionati nell'ambito dell'applicazione di un protocollo per la diagnosi della PMWS, ha consentito di selezionare 24 casi (già disponibili come sezioni di materiale fissato in formalina, incluso in paraffina e colorato con ematossilina-eosina) di polmonite con caratteri istologici di PNP. Per tutte era anche disponibile la colorazione con metodica immunohistochimica per PCV2 secondo quanto già riferito nel capitolo precedente. Sono state allestite, per ognuno dei 24 casi, ulteriori sezioni sottoposte a colorazione immunohistochimica (IHC) per PRRSV. L'indagine IHC per PRRSV è stata eseguita su sezioni di 4 micron utilizzando un anticorpo monoclonale (IgG1 di topo, clone SDOW17-A, Rural Technology, Incorporated, Brookings, South Dakota). Brevemente: le sezioni sono state sparaffinate e reidratate; le perossidasi endogene sono state bloccate con perossido di idrogeno al 3% in acqua distillata per 30'; successivamente, sono state sottoposte a preincubazione con "Protein block serum free" (DAKO X0909) per 10' a temperatura ambiente; le sezioni sono state incubate "over night" con l'anticorpo primario diluito 1:50; una volta lavate in tampone TRIS 0,15M, sono state incubate con anticorpo secondario e, successivamente, con il complesso streptavidina-biotina-perossidasi (DAKO LSAB kit peroxidase) entrambi per 15'. La reazione è stata evidenziata utilizzando diaminobenzidina (0,04% per 10') come cromogeno. Infine le sezioni sono state contrastate utilizzando ematossilina di Papanicolaou, disidratate e montate con DPX. Come controllo positivo è stato utilizzato il polmone di un suino risultato positivo alla PCR, per la ricerca del genoma di PRRSV-. Come controllo negativo sullo stesso tessuto è stato impiegato un anticorpo dello stesso

isotipo dell'anticorpo primario (IgG1), ma di irrilevante specificità.

3.3. Risultati

Caratteri istologici comuni nei casi selezionati erano, in un contesto di polmonite interstiziale da focale a diffusa caratterizzata da infiltrato macrofagico e linfoplasmacellulare, prevalentemente alveolo-settale: (1) ipertrofia ed iperplasia degli pneumociti di II tipo (Figura 3.1.) e (2) presenza di stampi intralveolari di materiale necrotico più o meno abbondante che occasionalmente presentava aggregati basofili, espressione di una intensa cariolisi. Solo 4 polmoni mostravano una focale necrosi bronchiolare e 12 una broncopolmonite che complicava il quadro di polmonite interstiziale. Complessivamente, dei 24 polmoni con PNP, 19 (79,17%) appartenevano a suini provenienti da allevamenti in cui era stata diagnosticata PMWS secondo il protocollo definito nel capitolo precedente, mentre 5 erano casi non riferibili ad allevamenti con diagnosi di PMWS.

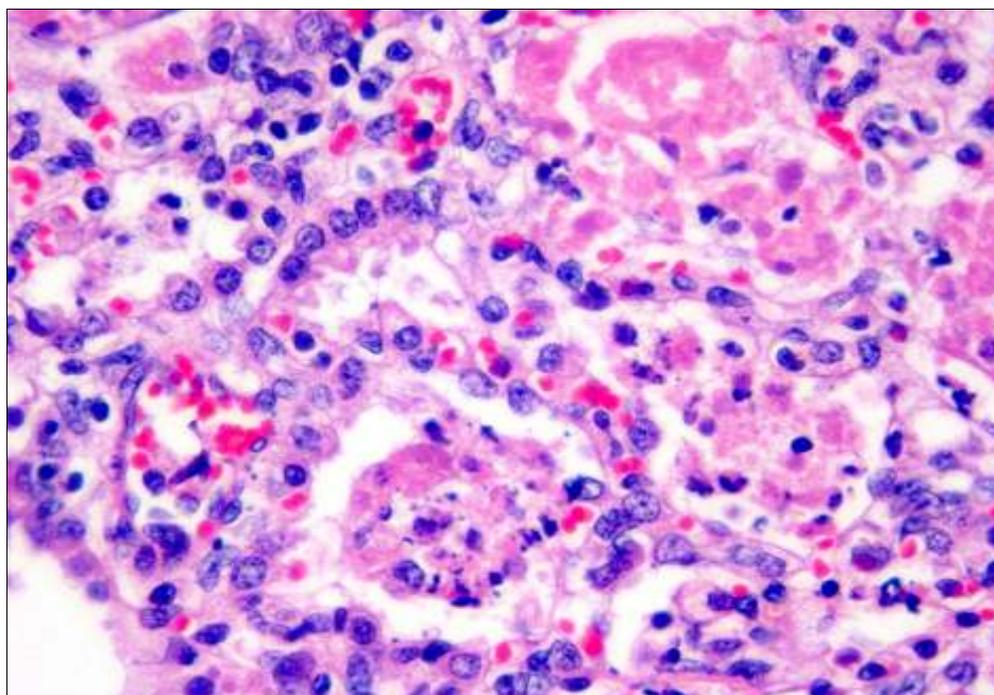


Figura 3.1. Iperptrofia e iperplasia dei pneumociti di tipo I, detriti necrotici intra-alveolari e infiltrato linfocitario nell'interstizio.

L'IHC per PCV2 ha evidenziato una positività da lieve a marcata in 11 casi (il 45,83% di tutti i polmoni con PNP ed il 57,9% di quelli appartenenti ad allevamenti con PMWS). Nei casi con segnale marcato, era intracitoplasmatico, nei macrofagi sia alveolo-settali che intralveolari, nelle cellule dendritiche del tessuto linfoide associato ai bronchi (BALT), occasionalmente nel materiale necrotico intra-alveolare ed in un solo caso in rari pneumociti ipertrofici (Figura 3.2.). Nei casi con più debole espressione erano positive le cellule dendritiche del BALT e rari istiociti alveolo-settali. Nei 4 polmoni in cui era presente una focale necrosi bronchiolare, il segnale per il PCV2 era molto intenso nell'infiltrato infiammatorio macrofagico e mancava nell'epitelio bronchiolare. L'indagine IHC per PRRSV ha mostrato positività nel complesso più debole, da lieve a moderata e da focale a multifocale, in 15 polmoni (62,5% del totale). Il segnale, sempre nei campi di PNP, si osservava nel citoplasma di pneumociti ipertrofici ed iperplastici, e nel citoplasma di alcuni macrofagi alveolo-settali. Più in dettaglio, come riportato in tabella 1, in 7 polmoni (il 29,16% del totale) era presente una co-infezione PRRSV-PCV2. Al contrario, mentre in 4 polmoni è stato evidenziato il solo PCV2, 9 mostravano positività IHC solo per PRRSV (37,5% del totale) di cui 5 di allevamenti non-PMWS e 4 di allevamenti con PMWS. Infine, in 4 casi di PNP (16,7% del totale) non è stata osservata positività né per PCV2 né per PRRSV (Tabella 3.1.).

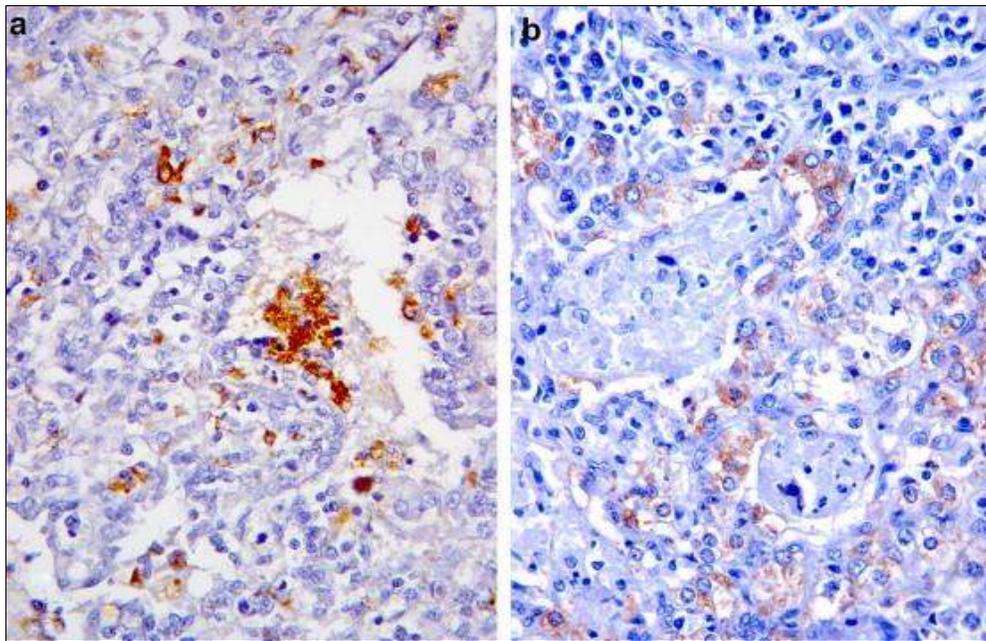


Figura 3.2. Sinistra: positività intensa all'antigene PCV2 dei macrofagi nei setti alveolari e nei detriti necrotici intraalveolari. Destra: debole positività all'antigene PRRSV nel citoplasma dei pneumociti di tipo 2. Immunoistochimica. Ob. 40x.

	PNP in allevamenti con PMWS		PNP in allevamenti senza PMWS e PCV2-
	PCV2 +	PCV2 -	
PRRSV +	7	4	5
PRRSV -	4	4	0

Tabella 3.1. Risultati dell'indagine immunoistochimica per PRRSV e PCV2 in 24 polmoni di suino con PNP, di cui 19 provenienti da allevamenti con diagnosi di PMWS e 5 da allevamenti negativi per PMWS. In 7 polmoni (il 29,16% del totale) era presente una co-infezione PRRSV-PCV2. In 4 polmoni è stato evidenziato il solo PCV2 (16,7 % del totale), in 9 solo il PRRSV (37,5% del totale di cui 5 di allevamenti non-PMWS e 4 di allevamenti con PMWS. Quattro casi (16,7% del totale) erano negativi per entrambi.

3.4. Discussione

I virus sospettati di essere responsabili della PNP sono, oltre al PRRSV e il PCV2, anche il SIV (Pesch *et al.*, 2000; Drolet *et al.*, 2003; Grau-Roma e Segalés, 2007) e l'ADV, al quale in Spagna è stata attribuita una responsabilità di lesioni polmonari a carattere necrotizzante (Segalés *et al.*, 1997; Grau-Roma e Segalés, 2007). Essendo PRRSV e PCV2 i due virus a cui viene riconosciuto il ruolo

principale nel determinismo della PNP, essi sono stati oggetto di questa indagine preliminare, senza comunque voler trascurare gli altri agenti eziologici in approfondimenti futuri.

Considerando che lo studio si è sviluppato su un campionamento eseguito in allevamenti con anamnesi di PMWS e che la maggior parte dei casi vengono da allevamenti con diagnosi conclusiva di PMWS, l'analisi dei risultati non potrà quindi prescindere da questo aspetto che per primo ne condiziona l'appartenenza di 19 polmoni con PNP a suini di allevamenti con PMWS e solo 5 ad allevamenti non-PMWS. D'altra parte, nonostante questa possibile distorsione, mentre in 9 polmoni (Tabella 3.1.) è stato evidenziato il solo PRRSV solo in 4 (tutti in polmoni di suini appartenenti ad allevamenti con PMWS) il PCV2 sembra essere l'unico presente dei due agenti indagati. I risultati del presente lavoro concordano sia con ricerche canadesi (Drolet *et al.*, 2003) che europee (Pesch *et al.*, 2000; Grau-Roma e Segalés, 2007) sul fatto che entrambi i virus in oggetto sembrano avere un ruolo nella eziologia della PNP (11 polmoni mostrano infezione). D'altra parte i nostri risultati si avvicinano maggiormente a quelli canadesi che riconoscerebbero un ruolo maggiore al PRRSV in quanto è più costante il suo riscontro nelle lesioni, piuttosto che quelli europei che vedrebbero il PCV2 come agente maggiormente coinvolto in questa patologia polmonare. La considerazione andrebbe però confermata anche in funzione di un campionamento in cui la PNP sia disgiunta dalla PMWS (solo 5 evenienze nella nostra casistica), come presumibilmente è accaduto negli studi già pubblicati. Al contrario, nonostante la nostra indagine abbia previsto la ricerca di soli due agenti eziologici, quello che accomuna i lavori citati ed il nostro è il riscontro di un certo numero di polmoni in cui non è stata rilevata la presenza di alcun virus indagato che lascia aperte ancora molte strade di approfondimento: 8 su 74 (10,8%, in Grau-Roma e Segalés, 2007), 4 su 60 (7%, in Drolet *et al.*, 2003), 4 su 24 (16,67%, nel presente studio). La percentuale leggermente maggiore nei nostri dati potrebbe essere attribuita al minor numero di agenti indagati. Altre considerazioni vanno condotte sulla localizzazione della positività immunostochimica. Infatti, mentre il PRRSV, quando presente, era prevalentemente localizzato nel citoplasma degli pneumociti ipertrofici, il PCV2 era

evidenziabile nel citoplasma di macrofagi alveolo-settali, in 4 casi in macrofagi alveolari ed in un solo caso in rari pneumociti ipertrofici. Questo potrebbe suggerire un importante ruolo del PRRSV nell'espressione morfologica dell'ipertrofia degli pneumociti, mentre del PCV2 nell'espressione della necrosi. Questo ruolo del PCV2 sarebbe anche confermato dal riscontro di bronchiolite necrotizzante ed abbondante materiale necrotico intra-alveolare in quei casi in cui l'IHC ha evidenziato un'alta carica virale di PCV2, dati che concordano con quanto riportato anche da Drolet et al. (2003) e Grau-Roma e Segalés (2007). Allo stesso modo, è ampiamente descritta ipertrofia ed iperplasia di pneumociti di II tipo in patologie polmonari in suini CD/CD (cesarean-derived, colostrum-deprived) indotte dal solo PRRSV inoculato sperimentalmente (Halbur *et al.*, 1995; Halbur *et al.*, 1996; Beyer *et al.*, 1998). È d'altra parte noto, ancora una volta in studi sperimentali (Harms *et al.*, 2001), come la coinfezione dei due virus in oggetto sia causa di quadri polmonari più gravi di quanto non avvenga nell'infezione dell'uno o dell'altro singolarmente.

3.5. Conclusioni

In base ai risultati della nostra indagine, la PNP è presente in Italia e non è solo una manifestazione pneumonica riscontrabile nel contesto della PMWS. I risultati emersi globalmente dimostrano una maggiore presenza di PRRSV nelle lesioni rispetto al PCV2, anche se la co-infezione sembra legata a quadri istolesivi più gravi.

Produzione scientifica originale

- Morandi F., Ostanello F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Sarli G. (2008) Indagine immunisto chimica sulla eziologia della polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) del suino in Italia: risultati preliminari. Atti 34° Meeting SIPAS, Modena, 13-14 marzo.
- Morandi F, Ostanello F, Fusaro L, Bacci B, Nigrelli A, Alborali L, Dottori M, Vezzoli F, Barigazzi G, Fiorentini L, Sala V, Leotti G, Joisel F, Sarli G. (2010) Immunohistochemical detection of etiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in italian pigs. J Comp Path, 142(1): 74-8.

CAPITOLO 4: Il ruolo di PCV2 nella patologia riproduttiva del suino

4.1. Introduzione

Negli ultimi anni, anche alcune patologie riproduttive sono state messe in relazione all'azione di PCV2: dalle prime segnalazioni di campo, in Canada (West *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2001) e in Danimarca (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001) relative all'isolamento di PCV2 da prodotti di aborto/natimortalità (Figura 4.1.), molta attenzione è stata rivolta, sia con indagini epidemiologiche mirate sia con infezioni sperimentali, a definire il possibile ruolo rivestito da questo virus nella patologia riproduttiva del suino. Tra i problemi più frequentemente riscontrati si annoverano un irregolare ritorno in estro, interruzione della gravidanza e aborto, riduzione della numerosità delle nidiate per aumento della mortalità neonatale (Almond *et al.*, 2006).



Figura 4.1. Feti suini. Due soggetti morti a fine gravidanza; due soggetti, mostranti edema ed emorragie, morti a uno stadio più precoce di gravidanza; un soggetto in fase iniziale di mummificazione.

Attualmente, la via di trasmissione più comune per PCV2 è quella oro-fecale (Sanchez *et al.*, 2010). Tuttavia, le patologie PCV2-associate si sono così rapidamente diffuse a livello mondiale che alcuni studi hanno considerato il possibile ruolo dell'inseminazione artificiale, anche se non è mai stato dimostrato con certezza (Vigre *et al.*, 2005; Wallgren *et al.*, 2007; Woodbine *et al.*, 2007).

E' stato dimostrato che un fattore di rischio importante per la patologia riproduttiva indotta da PCV2 è rappresentato da un episodio viremico che si realizza in una scrofa gravida con basso titolo anticorpale specifico (Calsamiglia *et al.*, 2007). La viremia è infatti un fattore cruciale della trasmissione del virus dalla madre ai feti e più a lungo questa si protrae, maggiore è la probabilità che tale evento accada (Sanchez, 2003). Tuttavia è stato dimostrato, mediante prove di infezione sperimentale, che non sempre l'inoculazione per vie diverse da quella genitale (ad esempio, direttamente in utero o infettando direttamente gli embrioni) è in grado di causare l'infezione dei feti (Gillespie, 2007). In tali condizioni, seppure la viremia si realizza, la patologia riproduttiva riscontrata è prevalentemente rappresentata da aborto e, in assenza di un riscontro di positività virologica nei feti, viene imputata allo stato di malessere generale (febbre, anoressia, ecc.) conseguente all'infezione e non ad una azione patogena diretta del virus sull'utero e/o sui prodotti del concepimento.

La viremia è il mezzo più frequente con cui PCV2 raggiunge l'embrione/feto; tuttavia, è stato dimostrato che PCV2 può infettare i prodotti del concepimento anche mediante veicolazione attraverso seme o ovuli infetti (Cariolet *et al.*, 2001; Bielanski *et al.*, 2004; Meteusen, 2007), o come conseguenza dell'infezione delle vie genitali (Bielanski *et al.*, 2004). Oltre che mediante trasmissione verticale con i gameti (Figura 4.2.), il virus può raggiungere i prodotti del concepimento attraversando la placenta, sia con meccanismo diretto (cioè con particelle virali libere nell'interstizio), sia mediato da cellule, in particolare macrofagi, che mascherano il virus ai meccanismi di controllo immunitario anche in animali che hanno sierconvertito (Pensaert *et al.*, 2004). In utero non è dimostrata la contemporanea infezione di tutti i feti: in genere l'evenienza

occorre in pochi soggetti e, seppure può propagarsi agli altri, procede lentamente in modo che solo pochi prodotti del concepimento sviluppano l'infezione e possono risultare positivi alle indagini diagnostiche (Sanchez, 2003).

Ad oggi, in numerosi studi è stato trattato e investigato il ruolo di PCV2 in infezioni sperimentali come l'inoculazione trans-uterina (Johnson *et al.*, 2002; Saha *et al.*, 2010), l'infezione oro-nasale di scrofe "specific pathogen free" (SPF) o convenzionali (Cariolet *et al.*, 2001; Pensaert *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005), l'inoculazione intrauterina di scrofe sieronegative per PCV2 o SPF (Yoon *et al.*, 2004; Rose *et al.*, 2007; Madson *et al.*, 2009) mentre mancano in letteratura indagini sulla possibile via d'infezione intrauterina tramite seme infetto in scrofe convenzionali.

La diagnosi della patologia riproduttiva causata da PCV2 presenta le stesse difficoltà già ampiamente messe in evidenza per la diagnosi delle altre patologie causate da questo virus.

In Italia, analogamente a quanto accade negli altri Paesi a suinicoltura avanzata, l'infezione da PCV2 è endemica negli allevamenti intensivi: la presenza di soggetti sieropositivi e/o l'evidenziazione del virus mediante PCR nei soggetti nella fase di svezzamento-magronaggio costituisce quindi una eventualità estremamente frequente e non è necessariamente la causa delle manifestazioni patologiche evidenziabili in allevamento. Il corretto protocollo diagnostico delle PCV2-related diseases prevede l'utilizzo dell'esame istologico che consente di evidenziare la presenza delle tipiche lesioni negli organi bersaglio; ad esempio, in corso di PMWS queste lesioni sono rappresentate dalla deplezione linfocitaria eventualmente associata a linfadenite granulomatosa con possibili flogosi interstiziali da linfocitarie a granulomatose in diversi parenchimi (Segalés *et al.*, 2004).

istologico (non sempre corredata anche di indagine immunohistochimica) sugli organi bersaglio (Bodgan *et al.*, 2001), con PCR abbinata alla sierologia (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001) o solo con esame istologico ed immunohistochimico sugli organi bersaglio (O'Connor *et al.*, 2001; Meteusen, 2007). Seppure esistono evidenze di una sensibilità degli embrioni e dei feti suini al

PCV2 in qualsiasi fase della gravidanza (Sanchez, 2003), si ritiene che le infezioni fetali contratte al

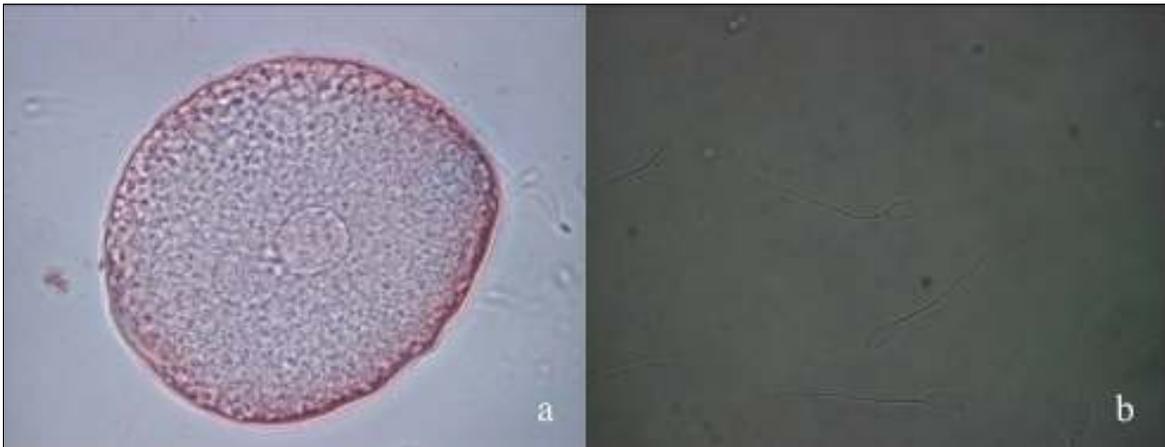


Figura 4.2. Oocita di suino, fecondato e mostrante il pronucleo maschile e femminile (a). Spermatozoi di suino in campo chiaro (b). Entrambi i gameti possono essere fonte di infezione da PCV2 per la blastocisti. La diagnosi di infezione fetale da PCV2 è stata eseguita mediante PCR abbinata all'esame prima del

57° giorno di gestazione (cioè prima dell'acquisizione dell'immunocompetenza fetale) siano quelle associate a conseguenze più gravi. In questi casi, la morte del feto e la sua successiva mummificazione sono degli eventi frequenti e sarà possibile mettere in evidenza il virus nei tessuti fetali in assenza di reattività sierologica specifica per PCV2. Viceversa, infezioni fetali che si realizzano dopo l'acquisizione della immunocompetenza, possano causare aborto e natimortalità; in questo caso, i suinetti sono sieropositivi e, in dipendenza dell'età gestazionale a cui è avvenuta l'infezione, anche positivi al virus (Pensaert *et al.*, 2004). Johnson (2002) ha dimostrato come il PCV2 possa replicare nei feti suini e causare lesioni in seguito ad inoculazione fetale transuterina. In questi casi, le principali lesioni anatomopatologiche a carico dei feti sono rappresentate dall'aumento di volume dei linfonodi, polmonite, miocardite diffusa, coalescente, non suppurativa e necrotizzante, in particolare nei soggetti nati morti o abortiti. Se le lesioni fetali e la distribuzione di PCV2 nel tratto riproduttivo, in oociti ed embrioni sono ben documentate, mancano in letteratura documentazioni sulla presenza di lesioni uterine e placentali.

Le lesioni a carico dei feto si rilevano in maggior misura in quelli che si infettano prima del 57° giorno di gestazione e quindi prima dello sviluppo dell'immunocompetenza. È noto, da indagini

sperimentali, che le blastocisti sono resistenti all'infezione fintanto che sono protette dalla zona pellucida (Gillespie, 2007); tuttavia, non sono state ancora condotte indagini sperimentali allo scopo di dimostrare quali possono essere le conseguenze patologiche sulla blastocisti se i gameti sono infetti. Studi epidemiologici hanno però dimostrato una associazione positiva tra presenza di PMWS in allevamento e aumento della percentuale di scrofe che ritornano in calore in assenza di sintomatologia clinica (Madec *et al.*, 2008). Tale osservazione potrebbe quindi indicare un potenziale ruolo patogeno, diretto o indiretto, esercitato da PCV2 sui prodotti del concepimento, almeno nella fase iniziale della gravidanza.

Esistono quindi numerose informazioni relative al ruolo svolto dal PCV2 nella patogenesi di fenomeni di natimortalità/aborto, mentre sono più scarse le conoscenze riguardanti il possibile ruolo di questo virus nelle primissime fasi della gravidanza. Per entrambi questi contesti patologici, non sono stati ancora sufficientemente approfonditi i percorsi diagnostici da applicare per dimostrare oggettivamente il ruolo del PCV2.

Un esempio di protocollo diagnostico da applicare in caso di sospetto coinvolgimento di PCV2 in problematiche riproduttive è riportato in Figura 4.3. La possibile infezione di solo una parte dei feti rende necessario applicare il protocollo diagnostico ad un gruppo di soggetti piuttosto che ad un unico feto. Sia da indagini sperimentali (Harms, 1999; West *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2001) sia dall'attività diagnostica condotta di routine su prodotti di natimortalità/aborto del suino (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001) emerge che l'azione patogena di PCV2 viene esercitata particolarmente sul cuore, milza, fegato e linfonodi. L'esame, mediante PCR di questi organi consente quindi di escludere dagli esami successivi tutti quei casi in cui non sia possibile mettere in evidenza la presenza di PCV2 nei feti. Nei casi in cui la PCR fornisca esito positivo, sarà necessario dimostrare la presenza di PCV2 all'interno delle lesioni (mediante esame istologico e immunoistochimica) ed esaminare sierologicamente i feti dopo il 57° giorno di gravidanza. Queste due ultime tecniche diagnostiche consentono di ridurre la quota di false positività causate dalla contaminazione del

campione al momento del prelievo o da condizioni di sola infezione da PCV2 in assenza di manifestazioni patologiche a carico del feto.

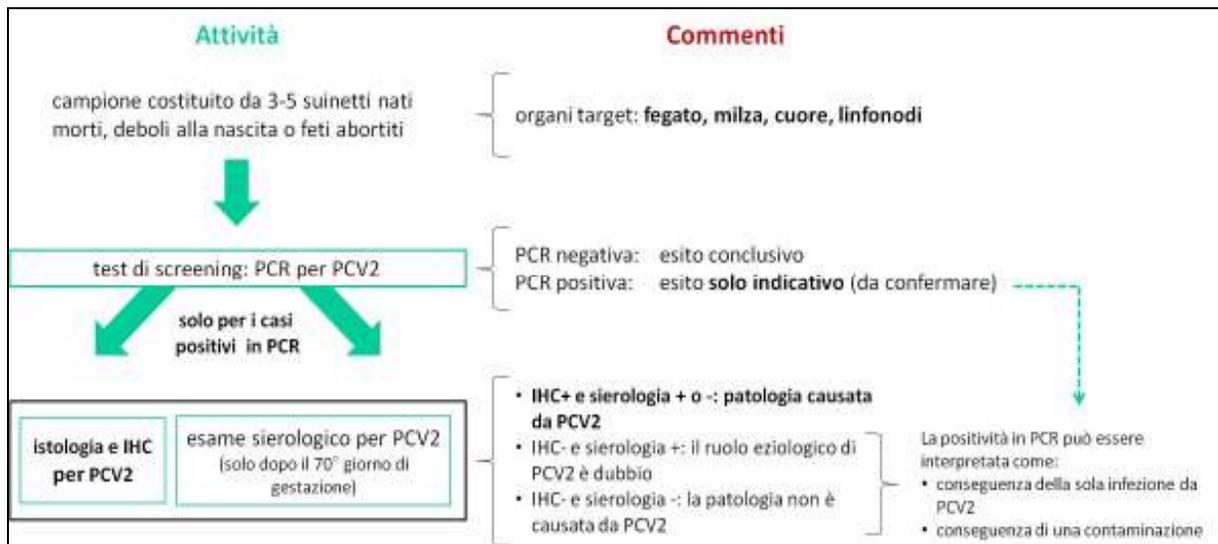


Figura 4.3. Schema di protocollo per la diagnosi di problematica riproduttiva indotta da PCV2.

4.2. Obiettivo

Scopo del presente studio è stato quello di valutare:

la possibilità di infettare scrofe convenzionali mediante l'uso di seme contenente PCV2;

il ruolo di PCV2 nella fase iniziale e intermedia di gravidanza.

4.3. Materiali e metodi

4.3.1. Animali

Nove scrofe Large White (95 kg di p.v., sei mesi di età), sono state acquistate presso un allevamento commerciale, acclimatate per cinque giorni e suddivise in due gruppi: controlli (gruppo C, 3 animali, identificati, singolarmente, come scrofa C28, C30 e C31) e infetti (gruppo I, 6 soggetti, I25, I26, I27, I29, I32, I33). I soggetti sono stati stabulati in *box* singoli e alimentati due

volte al giorno con una razione di mangime da gestazione. I due gruppi in sperimentazione sono stati stabulati in due locali diversi e sono state garantite rigorose misure di biosicurezza.

4.3.2. Protocollo sperimentale

Il protocollo sperimentale per lo studio è stato approvato dal Comitato Etico e Scientifico dell'Università di Bologna.

Il criolisato contenente il virus è stato prodotto a partire da una coltura di cellule PK- 15 infettate con un ceppo di PCV2 isolato in Italia nel corso di un focolaio di PMWS. Il virus utilizzato per l'inoculo aveva un titolo di $10^{3.9}$ TCID₅₀/ml valutato mediante immunofluorescenza indiretta usando un anticorpo monoclonale contro PCV2.

Il materiale seminale è stato prelevato da un verro (razza Large White) presente nello stabulario del Dipartimento di Morfofisiologia e Produzioni Animali (DIMORFIPA) della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna.

Preliminarmente, è stata valutata: l'assenza di PCV2 nel materiale seminale, la motilità e la concentrazione degli spermatozoi, nonché la possibile citotossicità della sospensione virale utilizzata per l'infezione. Sono state quindi preparate 9 dosi di materiale seminale, ciascuna costituita da 3×10^9 spermatozoi / 100 ml, in Androhep EnduraGuard (Minitube, Tiefenbach, Germany). Sei dosi sono state addizionate con 10 ml di sospensione virale, e tre dosi di 10 ml di terreno di coltura, privo di virus (controllo). Le dosi sono state incubate per 1h a temperatura ambiente prima della inseminazione artificiale (IA).

La sincronizzazione dell'estro è stata ottenuta somministrando per via intramuscolare Folligon® (Intervet,) alla dose di 1500 UI/scrofa e, dopo 60 ore, Corulon® (Intervet) alla dose di 750 UI/scrofa. Quaranta ore più tardi gli animali sono stati inseminati, utilizzando un catetere tipo Melrose, con una singola dose: le 6 scrofe del gruppo I hanno ricevuto seme infettato sperimentalmente; i 3 animali del gruppo C hanno ricevuto il seme addizionato del solo terreno di

coltura (controlli).

Giornalmente sono stati registrati la temperatura rettale e la presenza di eventuali segni clinici e/o di ritorno in calore.

4.3.3. Campionamento ante-mortem

Due giorni prima della fecondazione (giorno -2), da ciascuna scrofa sono stati realizzati tamponi vaginali, nasali e rettali, ed è stato prelevato un campione ematico. Successivamente gli stessi prelievi sono stati eseguiti con cadenza settimanale fino al 52° giorno post-inseminazione. Al fine di non interferire con il riconoscimento materno di gravidanza (giorni 13-18), le scrofe non sono state sottoposte a prelievo il 14° giorno post-fecondazione. Lo schema del campionamento è riportato in Tabella 4.1. Al 29° giorno di gestazione, tutti gli animali sono stati sottoposti ad esame ecografico. Le scrofe non gravide sono state sacrificate, mentre animali gravidi sono invece stati soppressi al 52° (C31), 55° (I25 e I26) e 56° (C28 e I29) giorno.

In tutti gli animali è stata inoltre valutata la concentrazione del progesterone ematico (P4), nell'arco di tempo compreso tra l'inizio della sperimentazione ed il 28° giorno, con l'eccezione delle scrofe non gravide, testate fino al giorno della soppressione. La valutazione è avvenuta attraverso dosaggi radioimmunologici: aliquote di siero da 200 µl sono state estratte con 5 ml di etere di petrolio; l'etere è stato separato ed evaporato sotto un getto di N₂; gli estratti sono quindi stati risospesi in 1 ml di tampone fosfato testandone aliquote da 100 µl. La sensibilità del saggio è pari a 1.0 pg/aliquota e i risultati vengono espressi in ng/ml (Tamanini *et al.* 1985).

	Giorni post-fecondazione										
Campioni e test di laboratorio	-2	7	14	21	28	35	42	49	52*	55*	56*
PCR tamponi (vaginali, rettali, nasali)	PCV2 PRRSV PPV ADV	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2
PCR sangue	PCV2	PCV2 /	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2
Sierologia*	PCV2	PCV2 /	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2
N° identificativo	Tutte le scrofe	Tutte le scrofe	Tutte le scrofe	Tutte le scrofe	Tutte le scrofe	Tutte meno C30 C32	Tutte meno C30 C32	I25 I26 C28 C29 C31	C31	I25 I26	C28 I29

Note: *Prelievi realizzati prima dell'eutanasia nella scrofa identificata nell'ultima riga in basso.

**Al giorno -2 posto-fecondazione e nel giorno dell'eutanasia è stata eseguita la titolazione anticorpale anche per PRRSv (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus), PPV (Porcine Parvovirus), ADV (Aujeszky's Disease Virus).

Tabella 4.1. Schema temporale di campionamento e tipo di test su essi eseguito.

4.3.4. Campionamento post-mortem

Alla necropsia sono stati prelevati campioni dei seguenti tessuti: tonsilla, linfonodi (inguinali superficiali, uterini e tracheo-bronchiali), ileo, milza, fegato, rene, utero, salpinge, ovaie, vagina, polmone, cuore. I feti sono stati numerati, pesati e ne è stata valutata la lunghezza e da ciascuno infine, si sono prelevati liquido amniotico, placenta (con tratto uterino corrispondente), fegato, milza e cuore.

Aliquote dei campioni sono state utilizzate per:

- 1) la ricerca del genoma virale mediante RT-PCR e PCR;
- 2) l'indagine istopatologica su un prelievo speculare (la metà opposta al campione usato per la RT-PCR) fissato in formalina tamponata al 10%, incluso in paraffina e colorato con ematossilina ed eosina (H-E) e metodica immunohistochimica per PCV2.

Sui tessuti fissati in formalina è stata realizzata una colorazione immunohistochimica con l'ausilio di anticorpi anti-PCV2 (Mab F217), alla diluizione di 1/100 in tampone fosfato, forniti dal Dr. G. Allan

(Veterinary Sciences Division, Belfast, UK), secondo il metodo descritto da Sarli *et al.* (2009), modificato utilizzando un complesso di rilevazione streptavidina-biotina-perossidasi polimerico (SuperPicture kit peroxidise, Zymed[®] Lab).

4.3. 5. Indagini sierologiche

Sui sieri prelevati lungo l'intero periodo di osservazione è stata condotta la determinazione dei titoli anticorpali anti PCV2; sui sieri prelevati ai giorni -2 e al giorno della soppressione della scrofa è stata condotta anche la ricerca di anticorpi anti PPV, ADV e PRRSV. La ricerca di anticorpi nei confronti di, PCV2, PPV, PRRSV e ADV è stata effettuata utilizzando ELISA competitive standardizzate presso l'IZSLER di Brescia (Brocchi *et al.*, 1990, Cordioli *et al.*, 1996, Sala *et al.*, 2000).

Dai tamponi e dal sangue prelevati durante l'intero periodo di sperimentazione è stata effettuata la ricerca mediante PCR del genoma virale di PCV2; dai tamponi e dal sangue prelevato al giorno -2 è stata effettuata anche la ricerca del genoma di PRRSV, PPV e ADV.

4.3.6. Metodica PCR

Relativamente a PCV2, l'acido nucleico virale è stato estratto dai campioni (siero, tamponi e tessuti) mediante Trizol (Invitrogen), in accordo con le istruzioni del produttore. L'amplificazione è stata condotta in accordo con il protocollo proposto da Olvera *et al.* (2004).

Per PRRSV, PPV, ADV sono stati rispettivamente seguiti i protocolli descritti da Bonilauri *et al.* (2003), Katz e Petersen (1992) e Kim *et al.* (2001).

4.4. Risultati

A quaranta ore dalla somministrazione di Corulon[®], in tutte le scrofe sono stati riscontrati segni di estro, ad esclusione del soggetto C31, già in estro al momento della sincronizzazione. Segni visibili di ritorno in calore si sono osservati soltanto nell'animale C31, a 15 giorni post-inseminazione, giorno in cui è stato nuovamente inseminato. Tale giorno è stato quindi assunto come giorno zero post-fecondazione solo in questo animale.

Al 23° giorno, la scrofa C30 ha abortito: gli embrioni e i rispettivi invogli sono risultati negativi alla ricerca del genoma di PCV2.

Al 29° DPI, l'indagine ecografica, ha confermato che cinque scrofe (I25, I26, I29, C28 e C31) erano gravide. Le tre non gravide (I27, I32, I33) che al 21° DPI non hanno avuto segni evidenti di estro non hanno presentato un aumento del progesterone ematico fino al 28° DPI.

Come riportato nel Grafico 4.1., nei soggetti I27 e I32 non sono state osservate variazioni nel titolo del P4 fino ai giorni 42 e 28, rispettivamente (quindi non è possibile dimostrare l'estro nei giorni precedenti). P4 è andato invece aumentando nel soggetto I33 dopo il 35° giorno, possibile espressione di estro dopo il 35°, seppur senza segni clinici evidenti.

Non è stato evidenziato nessun incremento dei titoli sierologici per PPV, ADV, PRRSV nei prelievi eseguiti a inizio e fine sperimentazione. Analogamente, nessun soggetto è risultato viremico per gli stessi agenti.

I titoli anticorpali all'inizio della sperimentazione (-2 DPI) per PCV2 sono stati elevati (intervallo 1/1000 -1/10000) in tutti gli animali, tranne in una scrofa, I25, (1/100).

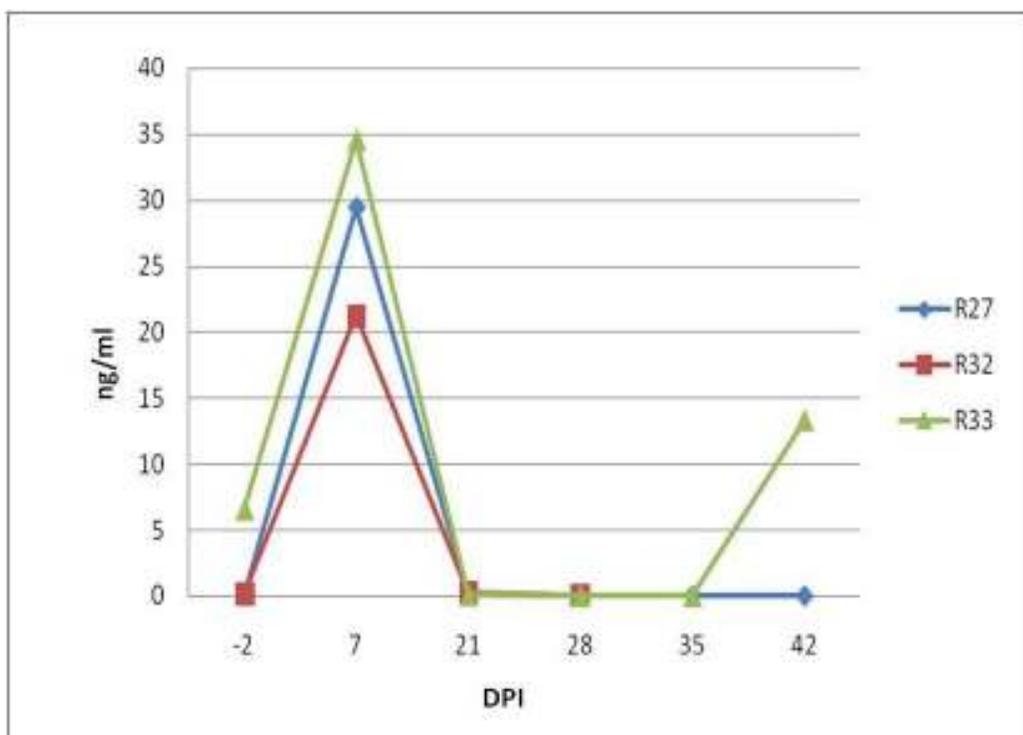


Grafico 4.1. Scrofe non gravide: titolo sierico di Progesterone (P4).

L'andamento dei titoli anticorpali per PCV2 durante il periodo ha evidenziato una diminuzione (seppur non significativa) già al secondo prelievo (giorno 7) negli animali del gruppo C, seguito da un plateau nei controlli; al contrario, i soggetti del gruppo I hanno mostrato valori più elevati, con diminuzione soltanto dopo il 42° giorno.

La ricerca del genoma di PCV2 nel siero ha dato esito positivo, ai giorni 7, 21, 28 e 35, nei soli animali del gruppo I (scrofe I25, I27, I29, I32). La scrofa I25, con basso titolo di anticorpi per PCV2, ha presentato viremia sia al 21° che 35° giorno, con valori compresi tra $1,10 \times 10^3$ copie genoma/ml e $8,0 \times 10^4$ copie genoma/ml ed un numero medio di cicli di RT-PCR che si è attestato intorno a 36; questo animale è stato l'unico ad eliminare il virus (positività di un tampone rettale al 35° giorno, con segnale al 37° ciclo con un risultato di $2,93 \times 10^3$ copie genoma/ml (Grafico 4.2.).

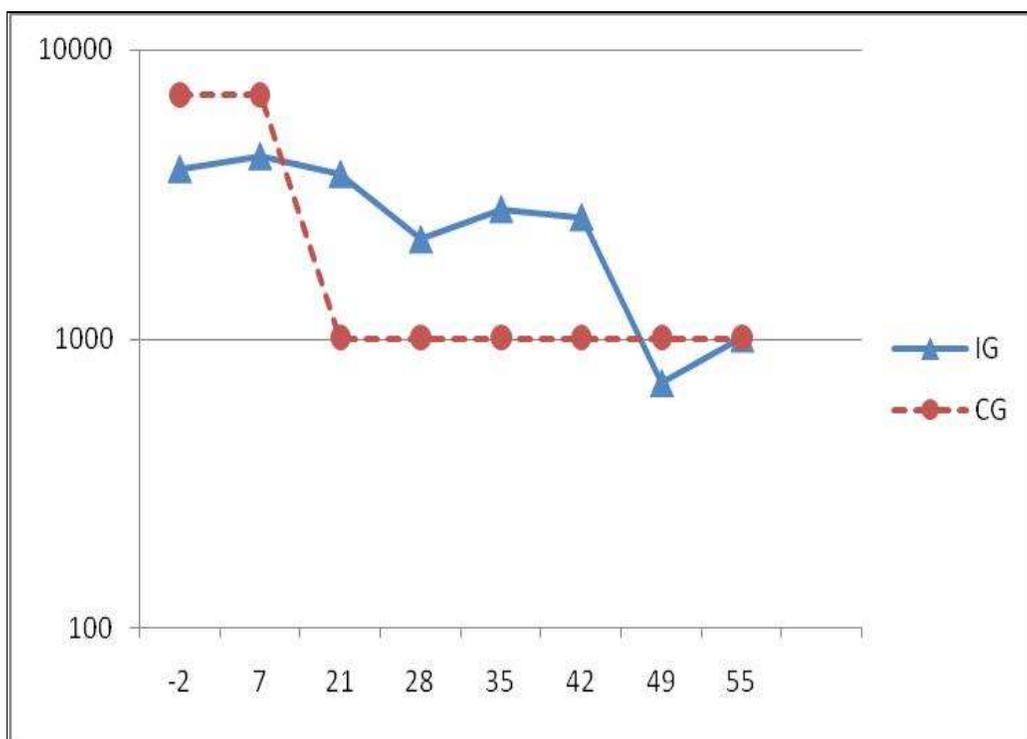


Grafico 4.2. Titolo sierico di anticorpi anti-PCV2.

Gli organi dei 6 animali infettati hanno evidenziato positività in RT-PCR in diversi tessuti (Tabella 2) con valori oscillanti tra $1,01 \times 10^3$ copie genoma/ml e $5,40 \times 10^6$ copie genoma/ml (con numero medio di cicli intorno a 32). Un unico picco ($4,01 \times 10^8$ copie genoma/ml) è stato osservato in un solo pool feto/placenta della scrofa I25 (feto/placenta n°16) a 21 cicli. Inoltre, la scrofa I25 ha presentato oltre ad un elevato numero di feti positivi per PCV2 (10 su 16), anche un'elevata concordanza di positività tra feto e tratto uterino corrispondente (8 casi su 10).

Alla necropsia si è osservata presenza di pleurite cronica fibrosa di grado lieve-moderato in quattro animali (I26, I32, C28, C30,); inoltre, tre casi di pericardite (in I26 e C30 di grado lieve, cronica, fibrosa; in C31 sierosa). La scrofa I29 ha presentato polmonite enzootica bilaterale cranio-ventrale. Sono stati osservati inoltre, un caso di peritonite siero-fibrinosa (I27) lieve e due casi (I32, C31) di epatite interstiziale multifocale lieve (fegato a macchie bianche). Tre soggetti hanno presentato lievi erosioni multifocali a carico dello stomaco. Edema e congestione della mucosa sono state le sole lesioni uterine rinvenute durante la necropsia di due soggetti (C30 e I33) non gravidi. Le scrofe gravide del gruppo I hanno presentato rispettivamente: 16, 11 e 7 feti, mentre i due

controlli 11 e 8 (Tabella 4.2.). Non sono state rilevate lesioni macroscopiche a carico dei feti.

	Scrofe gravide			Scrofe non gravide			Scrofe controllo		
	Infette			Infette			Non infette		
ID scrofe	25	26	29	27	32	33	28	30	31
N° feti	16	11	7	0	0	0	11	0	8
Titolo sierico anti-PCV2*	1/10 ²	1/10 ³	1/10 ²	1/10 ⁴	1/10 ⁴	1/10 ³	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁴
Uremia DPI**	21 35	-	21	28	-	-	-	-	-
Tonsille	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linfonodo uterino sx	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Linfonodo uterino dx	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Linfonodo tracheo-bronchiale	+	-	-	/	-	/	-	-	-
Cervice	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Feti (post/tot)	10/16	-	3/7	-	-	-	-	-	-
Liquido amniotico (PCR/tot)	-	1/11	-	-	-	-	-	-	-
Feto e tratto uterino corr. sx	8***	-	-	-	-	+	-	-	-
Feto e tratto uterino corr. dx	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: * titoli sierici all'inizio dell'esperimento; ** giorno/I post-inseminazione in cui è stata registrata viremia; *** dei 16 tratti uterini, ognuno corrispondente ad un feto, 8 erano positivi a PCV2 mediante PCR, ma solo in 7 casi c'era concordanza di positività in feti e tessuti uterini corrispondenti.

Tabella 4. 2. Risultati RT-PCR in tessuti e feti.

4.4.1. Esame istologico e immunoistochimico

Una placenta (positiva con PCR per DNA di PCV2 con maggiore carica virale, >108/ml) caratterizzata da necrosi focale lieve dell'epitelio corionico (Figure 4.5. e 4.6.), era positiva mediante immunoistochimica per l'antigene di PCV2 (Figure 4.7. e 4.8.), con positività citoplasmatica. Il feto dello stesso animale corrispondente alla placenta positiva, presentava positività citoplasmatica nel citoplasma degli epatociti (Figura 4.9.).

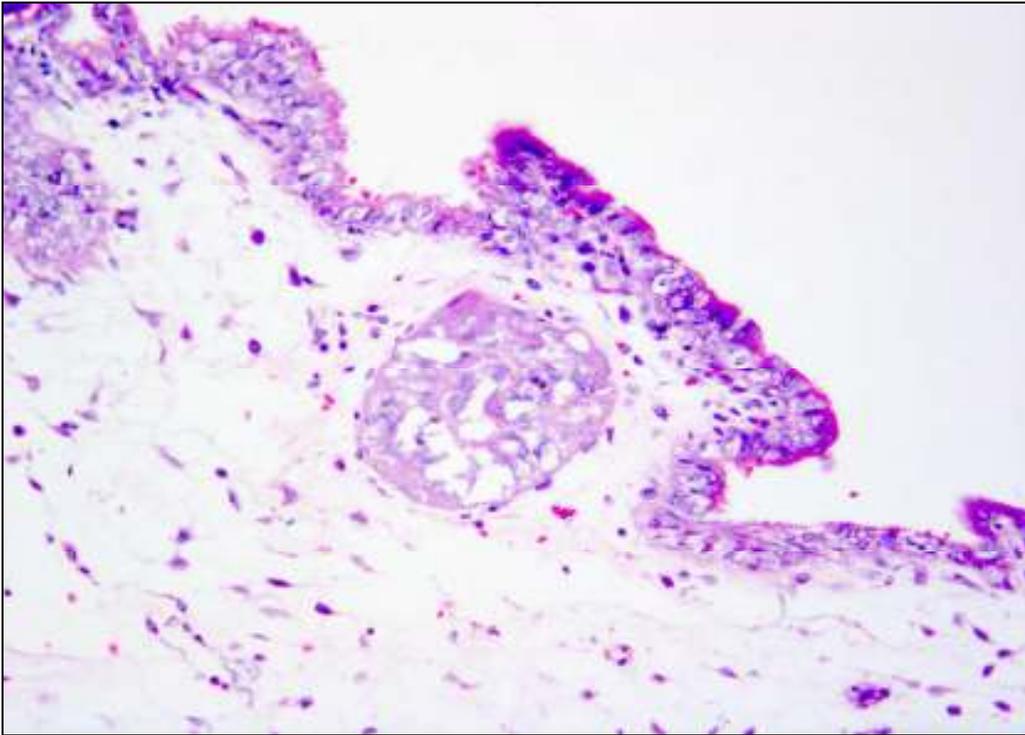


Figura 4.5. Placenta. Necrosi focale dell'epitelio del corion. E&E, 40X.

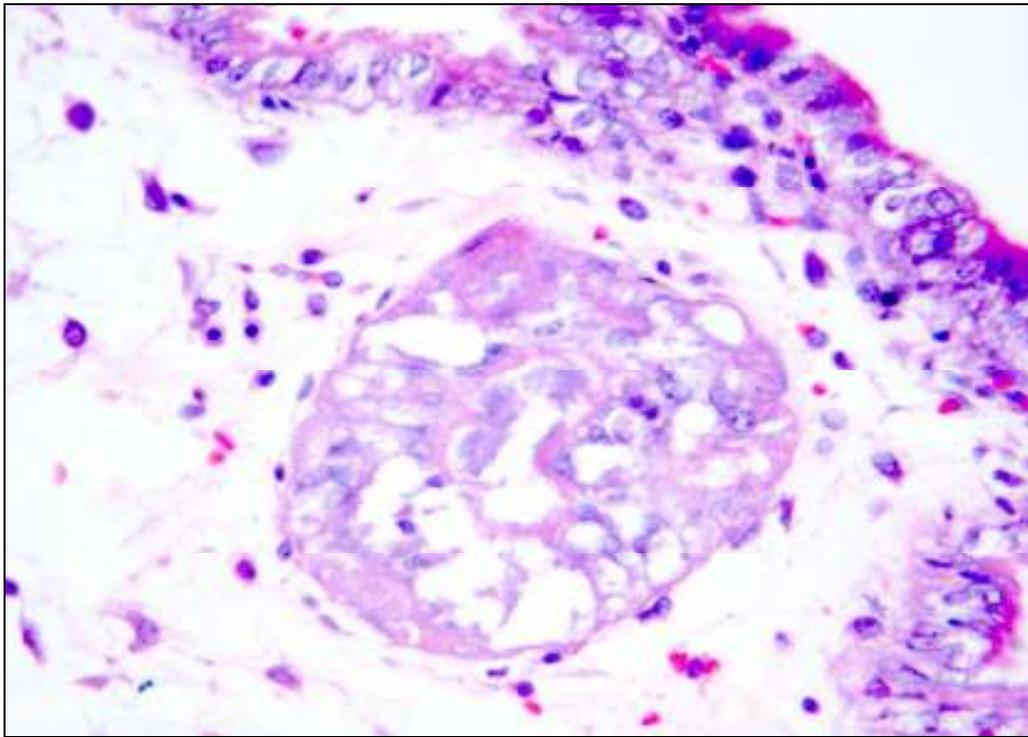


Figura 4.6. Placenta. Particolare della Figura 5. E&E, 40X.

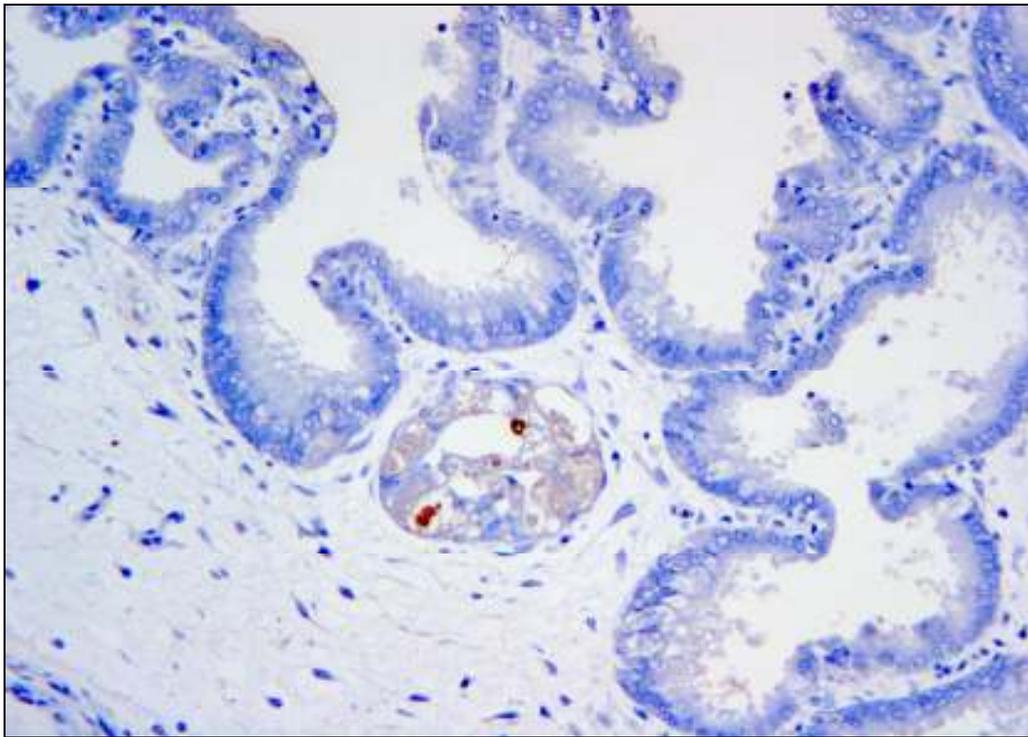


Figura 4.7. Placenta. Positiv  immunohistochemica per antigene di PCV2 nell'epitelio del corion. Immunohistochemica, 10X.

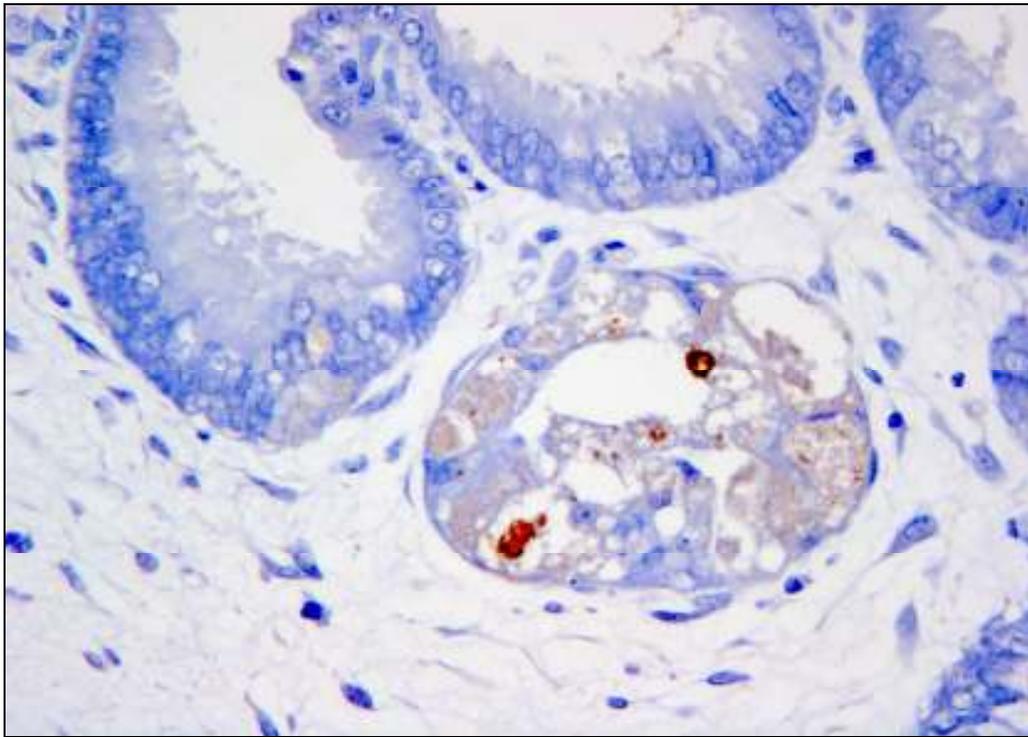


Figura 4.8. Placenta. Particolare dell'immagine precedente. Immunoistochimica, 40X.

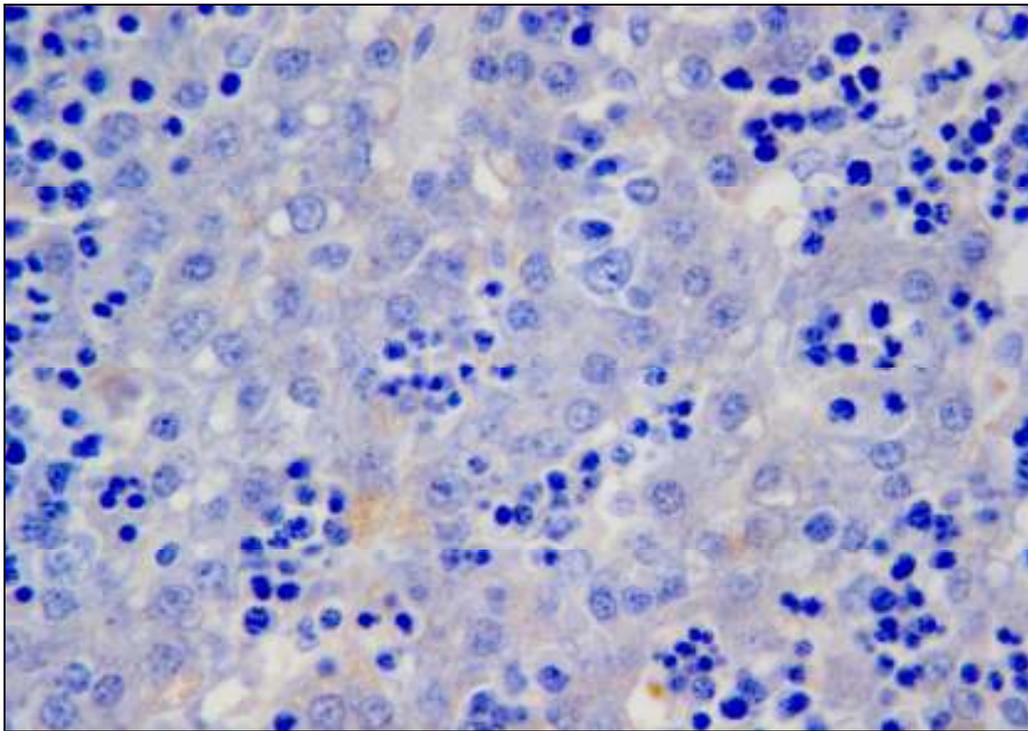


Figura 4.9. Feto. Debole positività immunoistochimica nel citoplasma degli epatociti. Immunoistochimica, 40X.

4.5. Discussione

Il presente studio ha dimostrato la possibilità di trasmissione intrauterina dell'infezione da PCV2 mediante l'impiego di seme infetto su scrofe convenzionali: 4 scrofe su 6 hanno presentato viremia rilevabile a partire dal 7° DPI. Inoltre, nel corso della sperimentazione, il titolo anticorpale anti PCV2 si è mantenuto più elevato per un periodo di tempo più lungo nei soli soggetti infetti, come probabile conseguenza della esposizione al virus. Tre animali infettati su 6 non sono risultati gravidi (nessun segno di ritorno in calore, nessun segno evidente di aborto) a differenza delle scrofe di controllo, tutte gravide anche se una ha abortito per cause non imputabili al PCV2. Nelle 3 scrofe non gravide del gruppo I, il dosaggio del progesterone ha dimostrato che la scrofa I33 aveva già ovulato quando è stata eseguita l'inseminazione, mentre le altre 2 (I27, I32) presentavano una condizione endocrinologica ottimale per la fecondazione, analogamente alle altre 3 scrofe del gruppo I e agli animali del gruppo C. La mancata gravidanza, unitamente alla dimostrazione di avvenuta infezione (viremia) in entrambi i soggetti del gruppo I risultati non gravidi, potrebbe far ipotizzare un possibile ruolo di PCV2 come causa di morte embrionale precoce. Nella sperimentazione, le scrofe non gravide sono rimaste in vita fino ad almeno il 29° giorno, senza manifestare evidenza di calore o incremento dei livelli ematici di progesterone.

Il modo più frequentemente utilizzato, in modelli sperimentali, per produrre l'esposizione dei feti è quello di causare un episodio viremico in scrofe gravide (Cariolet *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2005). Il modello sperimentale impiegato in questo studio ha avuto lo scopo di valutare se l'impiego di seme infetto potesse avere conseguenze più gravi sulla gravidanza e/o sul feto, in funzione della possibilità di moltiplicazione locale (uterina) del virus e quindi di esposizione nelle fasi iniziali della gravidanza, rispetto ad un evento viremico primario. Le viremie nei soggetti infetti sono state registrate piuttosto tardivamente (prevalentemente dal 21° giorno in poi) suggerendo che la moltiplicazione in utero è solo transitoria e non amplifica molto la carica virale. Verosimilmente, la viremia è stata la conseguenza del raggiungimento di organi bersaglio più idonei alla replicazione

virale, come il tessuto linfoide che, quindi, con il tempo, ha garantito e mantenuto la viremia stessa. Sembra quindi ipotizzabile, anche alla luce di quanto asserito da Segalés *et al.* (2007), che le vie genitali non siano un sito usuale di moltiplicazione del PCV2. In tal senso, l'entrata del virus con il seme non rappresenterebbe tanto un momento importante di esposizione, quanto piuttosto un evento prodromico per un possibile raggiungimento di organi bersaglio più idonei. In quest'ottica l'immunità gioca un ruolo importante nel ridurre la quantità di virus che può raggiungere i tessuti linfoidi prima e che attraverserà la placenta dopo. Ciò poiché la diffusione del virus agli organi bersaglio e la conseguente viremia vengono ostacolate dal titolo anticorpale anti-PCV2 (Calsamiglia *et al.*, 2007). A conferma di ciò, la scrofa I25, che presentava il più basso titolo anticorpale anti PCV2 al giorno -2, ha mostrato non solo viremia (in due prelievi successivi, giorno 21 e 35) ed eliminazione fecale, ma anche numerosi tessuti positivi, oltre che 10 feti positivi su 16 di cui per 8 vi era concordanza tra feto positivo e tratto uterino corrispondente.

E' noto in letteratura (Sanchez *et al.*, 2003) come l'esposizione in utero al PCV2 non determini l'infezione di tutti i feti, risultato registrato anche nel nostro esperimento. Quando l'infezione avviene, coinvolge i feti adiacenti e la trasmissione ha una possibilità maggiore di instaurarsi quanto più è lungo il periodo di post-infezione (Sanchez *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2004; Pensaert *et al.*, 2004; Saha *et al.*, 2010). Il presente studio proverebbe che attraverso la trasmissione verticale il numero di feti coinvolti può essere influenzato anche dal titolo anticorpale.

Perciò, l'entrata del virus col seme non è direttamente la causa dell'esposizione del *conceptus*, dal momento che la zona pellucida lo protegge dall'infezione da PCV2 (Mateusen *et al.*, 2007), ma è un evento prodromico affinché la viremia possa instaurare l'infezione fetale transplacentale. Questo è stato già confermato dagli studi di Madson e colleghi (2009). Dimostrarono che l'infezione tramite inseminazione artificiale può produrre suinetti sieropositivi a PCV2 (4/8) e che questi diventano infetti durante la seconda metà della gravidanza, tra il 55° e il 70° giorno di gestazione.

I risultati del nostro studio sembrano dimostrare che PCV2 non si replichi soltanto nei tessuti fetali,

come riportato in letteratura, ma anche nelle cellule dell'epitelio del corion, rappresentando una causa di necrosi condizionante la morte fetale con natimortalità/mummificazione. Quindi anche per il PCV2, analogamente a quanto riportato in talune patologie a diversa eziologia (Foster, 2007) anche le lesioni placentali si possono considerare il substrato anatomoistopatologico della patologia riproduttiva.

Infine, l'evidenziazione con l'immunoistochimica (IHC) di un solo campione (feto e placenta) su molti positivi alla PCR concorda con quanto descritto da Brunborg *et al.* (2004), i quali hanno dimostrato che il limite di sensibilità dell'immunoistochimica si abbia per campioni con una carica virale maggiore di 10^8 copie di genoma, esattamente quanto è avvenuto nell'unico caso positivo all'IHC osservato nel presente lavoro.

Questi aspetti suggeriscono che l'immunoistochimica può essere molto utile nella diagnosi di patologie riproduttive "acute" da PCV2. Questo avviene quando i gruppi sieronegativi per PCV2 diventano infetti durante la gravidanza in cui si registra un'infezione transplacentale importante con lesioni macroscopiche e istologiche evidenti e un'alta concentrazione virale nei feti.

Tale condizione si riscontra in campo soprattutto in gruppi di suini infettati di recente con virus, o in infezioni sperimentali di scrofe SPF (West *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2001; Cariolet *et al.*, 2001; Pensaert *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2007; Brunborg *et al.*, 2007; Madson *et al.*, 2009).

Al contrario, in casi di disordini riproduttivi "cronici" con basso titolo virale, l'RT-PCR è più appropriata perché più sensibile (Brunborg *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2010).

4.6. Conclusioni

Lo studio ha permesso di dimostrare che:

- 1) l'esposizione intrauterina in suini convenzionali può riprodurre l'infezione;

- 2) un basso titolo anticorpale aumenta la probabilità di infezione, dimostrando un ruolo protettivo degli anticorpi anti-PCV2 anche qualora la via di ingresso sia quella endouterina;
- 3) l'infezione da PCV2 contestualmente alla fecondazione, sembra ridurre la probabilità di gravidanza;
- 4) il substrato anatomoistopatologico della sofferenza fetale va individuato anche in lesioni placentali.

Se si accetta l'ipotesi, già parzialmente verificata, che PCV2 possa rivestire un ruolo importante nella patologia riproduttiva del suino, è evidente che le conoscenze relative alla prevalenza dell'infezione tra i riproduttori, ai fattori di rischio aziendali e alla patogenesi del danno sui prodotti del concepimento, diventano cruciali per la pianificazione di misure di controllo tendenti a minimizzare i danni o a controllare l'infezione. Dai dati emersi in questo studio risulta cruciale il livello anticorpale della popolazione in esame.

Produzione scientifica originale

- Fusaro L., Morandi F., Ferrara D., Sarli G., Leotti G., Ostanello F. (2009) Il ruolo del porcine circovirus tipo 2 (PCV2) nella patologia riproduttiva del suino. *Summa animali da reddito*, 7: 23 - 27.
- Sarli G., Morandi F., Panarese S., Bacci B., Ferrara D., Fusaro L., Bacci M.L., Govoni N., Dottori M., Bonilauri P., Lelli D., Leotti G., Vila T., Joisel F., Ostanello F. (2010) Scrofe convenzionali fecondate con seme artificialmente esposto a Circovirus Suino di tipo 2 (PCV2). *Atti XXXVI Meeting SIPAS (Società' Italiana Patologia e Allevamento Suini)*, Brescia, 25-26 Marzo.
- Morandi F., Panarese S., Bacci B., Ferrara D., Fusaro L., Bacci M.L., Galeati G., Dottori M., Bonilauri P., Lelli D., Leotti G., Vila T., Joisel F., Ostanello F. Sarli G. (2010): Conventional sows inseminated with artificially PCV2 infected semen. II. Post mortem results. *Proceedings of 21st IPVS Congress, 18-21 July Vancouver, British Columbia, Canada.* p.283.
- Sarli G., Morandi F., Panarese S., Bacci B., Ferrara D., Fusaro L., Bacci M.L., Galeati G., Dottori M., Bonilauri P., Lelli D., Leotti G., Vila T., Joisel F., Ostanello F. (2010): Conventional sows inseminated with artificially PCV2 infected semen. I. In vivo results. *Proceedings of 21st IPVS Congress, 18-21 July Vancouver, British Columbia, Canada.* p.458.

BIBLIOGRAFIA

- Alborali L., Morvan H. (2006) PMWS: evoluzione in Italia e Francia e proposta di un protocollo diagnostico. Atti XXX Corso in Patologia Suina e Tecnica dell'Allevamento, pp. 71-92.
- Allan G.M., McNeilly F., Kennedy S., Draft B., Clarke E.G., Ellis J.A., Haines D.M., Meehan B.M., Adair B.M. (1998) Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest*, 10: 3-10.
- Austin R., Bystrom J. (1991) Proliferative and necrotizing pneumonia in Manitoba. *Can Vet J*, 32: 371.
- Becskei Z., Aleksić-Kovačević S., Rusvai M., Balka G., Jakab C., Petrović T., Knežević M. (2010) Distribution of porcine circovirus 2 cap antigen in the lymphoid tissue of pigs affected by post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Acta Vet Hung*, 58 (4): 483-98.
- Beyer J., Fitchner D., Schirrmeyer H., Granzow H., Polster U., Weiland E., Berndt A., Wege H. (1998) Arterivirus PRRSV. Experimental studies on the pathogenesis of respiratory disease. *Adv Exp Med Biol*, 440: 593-599.
- Bielansky A., Laroche R., Argyle J., Magar R. (2004) Distribution of PCV-2 DNA in the reproductive tract, oocytes and embryos of PCV-2 antibody-positive pigs. *Vet Rec*, 155: 597-598.
- Bodgan J., West K., Clark E., Konoby C., Hines D., Allan G., McNeilly F., Meehan B., Ellis J.A. (2001) Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. *Can Vet J*, 42: 548-550.

- Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Meriardi G., Dottori M. (2003) Longitudinal study of PRRSV infection in 6 breeding herds by ELISA-antibody test and serum pooled PCR. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases- Roma June 29th July 2nd, pp.98-99.
- Brocchi E., Berlinzani A., Callegari S., Gamba D., Civardi A. (1990) Realizzazione di un test ELISA-competizione per distinguere animali infetti da virus di Aujeszky da animali vaccinati con vaccini gI-deleti. *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie*, 44: 913–917.
- Brunborg I.M., Jonassen C.M., Moldal T., Bratberg B., Lium B., Koenen F., Schönheit J.. (2007) Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *J Vet Diagn Invest*, 19(4): 368-75.
- Calsamiglia M., Fraile L., Espinal A., Cuxart A., Seminati C., Martín M., Mateu E., Domingo M., Segalés J. (2007) Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res Vet Sci*, 82: 299-304.
- Cariolet R., Blanchard P., Le Dimna M., Mahé D., Keranflec'h A., Julou P., Beaurepaire B., de Boissésou C., Troung C., Jestin A. (2001) Consequences of PCV2 experimental infection of non-immune SPF sows using the intra-uterine route. *Proc. of Congress on ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates*, p. 129.
- Cariolet R., Blanchard P., Le Dimna M., Mahé D., Jolly I.P., de Boissésou C., Truong C., Echobichon P., Madec F., Jestin A. (2001) Experimental infection of pregnant SPF sows with PCV2 through tracheal and muscular routes. *Proc. of Congress on ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates, Saint-Malo*, p.128.

- Cariolet R., Blanchard P., Le Dimna M., Mahé D., Jolly I.P., de Boisséson C., Truong C., Echobichon P., Madec F., Jestin A. (2001) Experimental infection of pregnant SPF sows with PCV2 through tracheal and muscular routes. Proc. of Congress on ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates, Saint-Malo, p. 128.
- Chae C. (2004) Post-weaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J*, 168: 41-49.
- Chae C. (2005) A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J*, 169: 326-336.
- Chiou M.T., Yang C.Y., Chaung T.C., Chen C., Lin L.F., Ye L.J. (2010) Shedding pattern and serological profile of porcine circovirus type 2 infection in caesarean-derived, colostrum-deprived and farm-raised pigs. *J Vet Med Sci*, Accepted Date: 22 Nov 2010, J-Stage Advanced Published Date: 6 Dec 2010.
- Collins J., Behfield D., Christiansen W., Harris L., Hennings J., Shaw D., et al. (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.
- Cooper V.L., Hesse R.A., Doster A.R. (1997) Renal lesions associated with experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *J Vet Diagn Invest*, 9: 198-201.
- Cordioli P., Sala G., Brocchi E., Gamban D., De Simone F., (1996) Diagnostic use of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Proc. 14th International Pig Veterinary Society Congress, p. 86.

- Corradi A., Dottori M., Gaidella L., Rosignoli C., Cantoni A. M., Luppi A., Bonilauri P., Meriardi G., Faccini S., Costa A., Leotti G., Cabassi E. (2004) Infezione da porcine circovirus tipo 2 (PCV-2) e aborto. *Atti SIPAS*, XXX, 215-221.
- Dea S., Bilodeau R., Sauvageau R., Montpetit C., Martineau G.P. (1992) Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J Diagn Invest*, 4: 380-392.
- Drolet R., Larochelle R., Morin M., Delisle B., Magar R. (2003) Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet Pathol*, 40: 143-148.
- Drolet, R., Thibault, S., D'Aillaire, S., Thomson, J., Done, S. (1999) Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *Swine Health Prod*, 7: 283–285.
- Ellis J., Krakowka S., Lairmore M., Haines D., Bratanich A., Clark E., Allan G., Konoby C., Hassard L., Meehan B., Martin K., Harding J., Kennedy S., McNeilly F. (1999) Reproduction of lesions of post-weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest*, 11: 806-809.
- Ellis J., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S., Allan G.M. (2004) Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol*, 98: 159-163.
- Finlaison D., Kirkland P., Luong R., Ross A. (2007) Survey of porcine circovirus 2 and postweaning multisystemic wasting syndrome in New South Wales piggeries. *Aust Vet J*, 85 (8): 304-310.
- Fiorentini L., Poggiali M., Tosi G., Paganelli F., Massi P. (2004) Descrizione di un caso di sindrome multisistemica del deperimento post-svezzamento (PMWS) associato all'isolamento di *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* in un allevamento suino del Nord Italia. *Atti SIPAS*, XXX, 407-412.

- Foster R., (2007) Female reproductive system. In McGavin and Zachary “Pathologic basis of Veterinary Diseases” cap. 18, IV Ed., Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 1290-1303.
- Fusaro L., Morandi F., Ferrara D., Leotti G., Sarli G., Ostanello F. (2009) Ruolo del porcine circovirus 2 (PCV2) nella patologia riproduttiva del suino. *Summa*, 7: 23-27.
- Ghebremariam M.K, Gruys E. (2005) Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs with particular emphasis on the causative agent, the mode of transmission, the diagnostic tools and the control measures. A review. *Vet Quart*, 27: 105-116.
- Gillespie T. (2007) PCVD: when immunology goes wrong, life on the farm becomes very expensive. Proc. of the 48th annual George A. Young Swine Health and management conference, pp. 1-6.
- Girard C., Morin R., Eialzhary Y. (1992) Experimentally induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia with an influenza A virus. *Vet Rec*, 130: 206-207.
- Grau-Roma L., Segalés J. (2007) Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky’s disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia(PNP) in Spain. *Vet Micr*, 119: 144-151.
- Grau-Roma L., Fraile L., Segalés J. (2011) Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet J*, 187 (1): 23-32.
- Ghebremariam M.K., Gruys E. (2005) Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs with particular emphasis on the causative agent, the mode of transmission, the diagnostic tools and the control measures. A review. *Vet Quart*, 27, 105-116.

- Halbur P.G., Paul P.S., Frey M.L., Landgraf J., Eeriness K., Meng X.J., Lum M.A., Andrews J.J., Rathje J.A. (1995) Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol*, 32: 648-660.
- Harding J.C.S. (2004) The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol*, 98: 131-135.
- Harms P. (1999) Hepatopathology associated with spontaneous type-2 porcine circovirus infection in caesarean derived/colostrum deprived pigs. *Proc of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 42: 4.
- Harms P.A., Soerden S.D., Halbur P.G., Bolin S.R., Lager K.M., Morozov J., Paul P.S. (2001) Experimental reproduction of severe disease in CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol*, 38: 528-539.
- Hélie P., Drolet R., Germain M.-C., Bourgault A. (1995) Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in south western Quebec. *Can Vet J*, 36: 150-154.
- Hinrichs U., Ohlinger V.F., Pesch S. (1999) First report of porcine circovirus type 2 infection in Germany. *Tieraerztl Umsch*, 54: 255–258.
- Johnson C.S., Joo H.S., Direksin K., Yoon K.J., Choi Y.K. (2002) Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest*, 14: 507-512.
- Katz J.B., Petersen J.C. (1992). Molecular analysis of pseudorabies viral vaccines and their rapid differentiation from wild-type isolates using DNA-amplified glycoprotein I and thymidine kinase gene segment polymorphism. *Biologicals* 20,187-195.

- Kennedy S., Allan G., McNeilly F., Adair B.M., Hughes A., Spillane P. (1998) Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet Rec*, 142 (18): 495-6.
- Kim J., Choi C., Han D.U., Chae C. (2001) Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. *Vet Rec*, 149: 304-5.
- Kim J., Ha Y., Jung K., Choi C., Chae C. (2004) Enteritis associated with Porcine Circovirus 2 in pigs. *Can J Vet Res*, 68 (3): 218-221.
- Kiupel M., Stevenson G.W., Mittal S.K., Clark E.G., Haines D.M. (1998) Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Vet Pathol*, 35: 303-307.
- Krakowka S., Ellis J.A., McNeilly F., Ringler S., Rings D.M., Allan G. (2001) Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol*, 38: 31-42.
- Ladekjaer-Mikkelsen A.S., Nielsen J., Storgaard T., Bøtner A., Allan G., McNeilly F. (2001) Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Vet Rec*, 148: 759-760.
- Larochelle R., Sauvageau R., Magar R. (1994) Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Québec. *Can Vet J*, 35: 513-515.
- LeCann P., Albina E., Madec F., Cariolet R., Jestin A. (1997) Piglet Wasting Disease. *Vet Rec*, 141: 660.
- Luppi A., Merialdi G., Bonilauri P., Dottori M., Cantoni A.M., Cabassi E., Corradi A. (2004) Grading cito-istologico delle lesioni linfonodali in corso di PMWS de suino. *Atti SIPAS*, XXX, 477-485.

- Madec F., Rose N., Grasland B., Cariolet R., Jestin A. (2008) Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome and Other PCV2-Related Problems in Pigs: a 12-Year Experience. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55: 273-283.
- Mandrioli L., Sarli G., Ostanello F., Sidoli L., Caprioli A., Preda P., Segalés J., Marcato P.S. (2003) Nefrite interstiziale associata all'infezione da PCV-2 del suino. *Atti SIPAS*, XXIX, pp. 297-302.
- Marcato P.S., Sidoli L., Mandrioli L., Della Salda L., Cerati C., Rolla G.L. (1999) Indagini clinico patologiche in un focolaio di PMWS (Postweaning multisystemic wasting syndrome) in suini del nord Italia. *Large Animals Review*, 5(2): 47-62.
- Marruchella G., Cossettini C., Cabassi E., Corradi A., Di Lecce R., Pinoni C., Candotti P. (2001) La sindrome dermatite nefrite del suino (PDNS): rilievi clinici, anatomo-istopatologici e virologici in un allevamento del Nord-Italia. *Atti SIPAS XXVII*, 169-178.
- Martelli P., Terreni M., Borghetti P., Amenna N., Morvan H., Cavirani S. (2000) Aspetti clinici e diagnostici in corso di un focolaio di sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (PMWS). *Atti SIPAS*, XXVI, 255-269.
- Mateusen B., Maes D.G., Van Soom A., Lefebvre D., Nauwynck H.J. (2007) Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenology*, 68: 896-901.
- Morandi F., Ostanello F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Sarli G. (2008) Indagine immunoistochimica sulla eziologia della polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) del suino in Italia: risultati preliminari. *Atti 34° Meeting SIPAS*, Modena, 13-14 marzo.
- Morandi F., Ostanello F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F., Sarli G. (2010) Immunohistochemical

detection of etiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in italian pigs. *J Comp Path*, 142(1): 74-8.

- Morandi F., Panarese S., Bacci B., Ferrara D., Fusaro L., Bacci M.L., Galeati G., Dottori M., Bonilauri P., Lelli D., Leotti G., Vila T., Joisel F., Ostanello F. Sarli G. (2010): Conventional sows inseminated with artificially PCV2 infected semen. II. Post mortem results. Proceedings of 21st IPVS Congress, 18-21 July Vancouver, British Columbia, Canada. p.283.
- Morin M., Girard C., Eialzhary Y., Fajardo R., Drolet R., Lagacé A. (1990) Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognised disease. *Can Vet J*, 31: 837-839.
- O'Connor B., Gauvreau H., West K., Bogdan J., Ayroud M., Clark E.G, Konoby C., Allan G., Ellis J.A. (2001). Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J*, 42: 551-553.
- Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M. (2004): Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods*, 117(1):75-80.
- Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG (2007) Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest*, 19: 591–615.
- Opriessnig T., Fenaux M., Thomas P., Hoogland M.J., Rothschild M.F., Meng X.J., Halbur P.G. (2006) Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Vet Pathol*, 43: 281-296.

- Park J.S., Kim J., Ha Y., Jung K., Choi C., Lim J.K., Kim S.H., Chae C. (2005) Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol*, 132: 139-144.
- Pensaert M.B., Sanchez J.R., Ladekjaer-Mikkelsen A.S., Allan G., Nauwynck H.J. (2004) Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol*, 98: 175-183.
- Pesch S., Schmidt U., Ohlinger V.F. (2000) Proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) is a result of co-infection with porcine reproductive and respiratory disease (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). In: *Proceedings of IPVS Congress*, 16: 581.
- Poljak Z., Dewey C.E., Rosendal T., Friendship R.M., Young B., Benke O. (2011) Spread of porcine circovirus associated disease (PCVAD) in Ontario (Canada) swine herds: Part 1. Exploratory spatial analysis. *BMC Vet Res*, 30: 59.
- Rose N., Blanchard P., Cariolet R., Grasland B., Amennay N., Oger A., Durandz B., Balaschy M., Jestin A., Madec F. (2007) Vaccination of porcine circovirus type 2 (PCV2)-infected sows against porcine parvovirus (PPV) and erysipelas: effect on post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and on PCV2 genome load in the offspring. *J Comp Pathol*, 136: 133-144.
- Sala G., Rigola S., Alborali G.L., Brocchi E., Cordioli P. (2000) Development of monoclonal antibodies based ELISAs for the detection of antibodies against porcine circovirus type 1 and type 2. *Proceeding of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology*, Brescia, Italy, 253-254.
- Sanchez J.R. (2003) Pathogenesis of PCV2 infections in pigs from foetal to early postnatal life. PhD thesis, University of Ghent (Belgium).

- Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Sala V., Leotti G. (2007) Applicazione di un protocollo per la diagnosi di PMWS. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini. XXXIII Meeting Annuale, 189-202.
- Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G. (2008) Diagnosi di PMWS in Italia: risultati di 18 mesi di attività. Atti XXXIV Meeting SIPAS (Società Italiana Patologia e Allevamento Suini), Modena, 13-14 marzo.
- Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2008) Diagnosis of PMWS in Italy: application of an histological/immunohistochemical tool on a group based sampling. Proceedings XXXIV IPVS Congress, 22-26 June 2008, Durban (South Africa).
- Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G. (2008) Diagnosi di PMWS in Italia. Large Animals Review, 14: 119-126.
- Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Gnudi M., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2009) Application of a protocol for the diagnosis of PMWS in Italy. Vet Rec, 164: 519-523.
- Sarli G., Morandi F., Panarese S., Bacci B., Ferrara D., Fusaro L., Bacci M.L., Govoni N., Dottori M., Bonilauri P., Lelli D., Leotti G., Vila T., Joisel F., Ostanello F. (2010) Scrofe convenzionali fecondate con seme artificialmente esposto a Circovirus Suino di tipo 2 (PCV2). Atti XXXVI Meeting SIPAS (Società Italiana Patologia e Allevamento Suini), Brescia, 25-26 Marzo.

- Sarli G., Morandi F., Panarese S., Bacci B., Ferrara D., Fusaro L., Bacci M.L., Galeati G., Dottori M., Bonilauri P., Lelli D., Leotti G., Vila T., Joisel F., Ostanello F. (2010): Conventional sows inseminated with artificially PCV2 infected semen. I. In vivo results. Proceedings of 21st IPVS Congress, 18-21 July Vancouver, British Columbia, Canada. p.458.
- Segalés J., Balasch M., Domingo M., Carvalho L.F., Pijoan C. (1997) Immunohistochemical demonstration of the spread of pneumotropic strain of Aujeszky's disease virus in conventional pigs. *J Comp Pathol*, 116: 387-395.
- Segalés J., Piella J., Marco E., Espuna E., Domingo M. (1998) Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Vet Rec*, 142: 483-486.
- Segalés J., Rosell C., Domingo M. (2004) Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol*, 98: 137-149
- Segalés J., Allan G.M., Domingo M. (2005) Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Review*, 6: 119-142.
- Segales, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grasland, B., Bækbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec*, 162: 867–868.
- Smith W.J., Thomson J.R., Done S. (1993) Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec*, 132 (2): 47.
- Straw B.E., Dewey C.E., Wilson M.R. (1999) “Differential diagnosis of swine diseases” in Straw, B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. (Eds) *Diseases of Swine*, eighth ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 41-89.

- Tamanini C, Bono G, Cairoli F, Chiesa F. Endocrine responses induced in anestrus goats by the administration of different hormones after fluoregestone acetate treatment. *Anim Reprod Sci* 1985; 9: 357–64.
- Thibault S., Drolet R., Germain M.C., D'Allaire S., Larochelle R., Magar R. (1998) Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol*, 35: 108-116.
- Tischer I., Gelderblom H., Vettermann W., Koch M.A. (1982) A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 295: 64-6.
- Verin R., Tursi M., Guarda F., Lorenzi D., Millanta F., Poli A. (2004) Lesioni glomerulari associate alla presenza di circovirus tipo II in suini regolarmente macellati nel Nord Italia. *Atti SIPAS*, XXX, pp. 465-470.
- Wellenberg G.J., Stockhofe-Zurwieden N., Boersma W.J., De Jong M.F., Elbers A.R. (2004) The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case-control study. *Res Vet Sci*, 77: 177-184.
- Wensvoort G. (1993) Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Vet Res*, 24: 117-24.
- West K.H., Bystrom J.M., Wojnarowicz C., Shantz N., Jacobson M., Allan G.M., Haines D.M., Clark E.G, Krakowka S., Mac Neilly F., Konoby C., Martin K., Ellis J.A. (1999) Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11, 530-532.