

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**MORFOFISIOLOGIA E PATOLOGIA VETERINARIA CON
APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE**

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: Patologia veterinaria e Ispezione degli alimenti di origine animale (07/H2)

Settore Scientifico disciplinare: Patologia generale ed anatomia patologica veterinaria (VET/03)

TITOLO TESI

**RUOLO DEL PORCINE CIRCOVIRUS TIPO 2 (PCV2) NELLA
PATOLOGIA RIPRODUTTIVA DEL SUINO**

Presentata da: Dott. Domenico Ferrara

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Eraldo Seren

Prof. Giuseppe Sarli

Esame finale anno 2012

*Al mio professore
Giuseppe Sarli*

INDICE

PREMESSA	5
1 PATOLOGIE DA PORCINE CIRCOVIRUS TIPO 2 DEL SUINO.....	7
1.1 Introduzione.....	7
1.2 Agente eziologico	9
1.3 Patologie associate al PCV2	12
1.3.1 PMWS	14
1.3.2 PDNS	22
1.3.3 PRDC	24
1.3.4 PNP	25
1.3.5 Linfadenite necrotizzante	27
1.3.6 Enterite granulomatosa associata al PCV2	27
1.3.7 Disordini riproduttivi	28
1.3.8 Epidermite essudativa o Greasy pig disease	30
2 RISULTATI SULL’IMPIEGO DI UN PROTOCOLLO DIAGNOSTICO PER LA VALUTAZIONE DEL COINVOLGIMENTO DEL PCV2 NELLA PATOLOGIA RIPRODUTTIVA DEL SUINO.....	44
2.1 Introduzione.....	44
2.2 Materiali e metodi.....	45
2.2.1 Casistica	45
2.2.2 Necroscopia e prelievo dei campioni	45
2.2.3 Protocollo diagnostico utilizzato.....	48
2.3 Risultati	52
2.4 Discussione.....	54
2.5 Conclusioni.....	56
3 SCROFE CONVENZIONALI FECONDATE CON SEME ARTIFICIALMENTE INFETTATO CON PCV2	60
3.1 Introduzione.....	60
3.2 Materiali e metodi.....	65
3.2.1 Benessere animale	65
3.2.2 Animali e stabulazione.....	65
3.2.3 Preparazione del PCV2 utilizzato per l’inseminazione.....	67
3.2.4 Preparazione del materiale seminale utilizzato per l’inseminazione	67
3.2.5 Protocollo sperimentale.....	67
3.2.6 Campionamento <i>in vivo</i>	69
3.2.7 Campionamento <i>post-mortem</i>	71
3.2.8 Dosaggio progesterone.....	72
3.2.9 Metodica PCR	73
3.2.10 Indagini sierologiche	73
3.2.11 Istologia ed immunoistochimica	74
3.3 Risultati	75
3.3.1 Sincronizzazione e diagnosi di gravidanza	75
3.3.2 Risultati sierologici e virologici <i>intra vitam</i>	76
3.3.3 Risultati <i>post-mortem</i>	78

3.3.3.1	Lesioni macroscopiche	78
3.3.3.2	Lesioni microscopiche	79
3.4	Discussione.....	82
3.5	Conclusioni.....	84

4 INFEZIONE SPERIMENTALE CON SEME PCV2 POSITIVO IN SCROFE

CONVENZIONALI VACCINATE E NON VACCINATE91

4.1	Introduzione.....	91
4.2	Materiali e metodi.....	92
4.2.1	Benessere animale.....	92
4.2.2	Animali e stabulazione.....	92
4.2.3	Preparazione del PCV2 utilizzato per l'inseminazione.....	95
4.2.4	Preparazione del materiale seminale utilizzato per l'inseminazione	95
4.2.5	Protocollo sperimentale.....	96
4.2.6	Campionamento <i>in vivo</i>	97
4.2.7	Campionamento <i>post-mortem</i>	99
4.2.8	Dosaggio progesterone.....	100
4.2.9	Metodica PCR	100
4.2.10	Indagini sierologiche.....	101
4.2.11	Istologia ed immunoistochimica	101
4.3	Risultati	103
4.3.1	Sincronizzazione, diagnosi di gravidanza e sacrificio degli animali	103
4.3.2	Risultati sierologici e virologici <i>intra vitam</i>	105
4.3.3	Risultati <i>post-mortem</i>	113
4.3.3.1	Lesioni macroscopiche	113
4.3.3.2	Lesioni microscopiche	117
4.4	Discussione.....	119
4.5	Conclusioni.....	122

PREMESSA

La patologia infettiva del suino è caratterizzata soprattutto dalla presenza di malattie multifattoriali; una di queste è sostenuta dal porcine circovirus tipo 2 (PCV2).

Questo virus è ritenuto responsabile di notevoli perdite economiche in allevamenti suinicoli in virtù della sua capacità di creare problemi a carico di vari apparati (cutaneo, urinario, cardiovascolare, nervoso, linfatico, respiratorio e gastrointestinale) compreso quello riproduttivo (malattie riassunte nell'acronimo PCVDs).

Il ruolo del PCV2 nella patologia riproduttiva, sebbene suffragato da osservazioni di campo e sperimentali, non è ancora completamente noto nella sua patogenesi, soprattutto nelle prime fasi di gravidanza. Ciò è soprattutto conseguenza della scarsa standardizzazione dei protocolli diagnostici volti a mettere in evidenza il patogeno e ad attribuirgli un ruolo nella patologia di campo.

In veste di Dottorando in “Morfofisiologia e Patologia Veterinaria con Applicazioni Biotecnologiche” ho preso parte a tre differenti progetti condotti prima nel Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale poi confluito nel Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

Tali progetti sono stati svolti in collaborazione con differenti gruppi di ricerca: *Merial Italia*, *Merial Francia*, Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER, sezioni diagnostiche di Brescia e Reggio Emilia), docenti della sezione di Fisiologia Veterinaria del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie di Bologna.

Il primo progetto, che mi ha visto impegnato per i primi due anni di dottorato (2009-2010), era parte di un programma di sorveglianza che si poneva l'obiettivo di ricercare con metodiche quali reazione a catena della polimerasi (PCR) e immunostochimica (IIC) il PCV2 in prodotti di natimortalità/aborto del suino.

Nello stesso arco temporale, allo scopo di meglio comprendere il ruolo eziologico svolto dal PCV2 nella natimortalità/aborto del suino, ho preso parte a un esperimento di riproduzione sperimentale dell'infezione da PCV2 in soggetti convenzionali usando quale via d'infezione quella genitale. Poiché come conseguenza dell'infezione da PCV2 delle vie genitali sono attribuite alcune patologie quali: ritorno in calore, aborto, mummificazione e natimortalità, è stata riprodotta un'infezione sperimentale da PCV2 mediante inseminazione artificiale con seme infetto e ne sono stati valutati gli effetti sui tessuti materni e fetali.

In virtù dei buoni risultati ottenuti in quest'ultimo lavoro, negli ultimi due anni di dottorato (2010-2011) ho preso parte a un progetto di ricerca, finanziato sempre da *Merial Francia*, volto a valutare se la bassa immunità umorale naturale potesse rappresentare un'importante facilitazione nella riproduzione dell'infezione e se l'omogeneità del titolo anticorpale indotto dalla vaccinazione confrontato con la condizione di eterogeneità del titolo d'immunizzazione naturale potesse rappresentare un fattore importante di riduzione della possibilità di sviluppare infezione da PCV2.

Ciascuno dei progetti sopraelencati è oggetto di un capitolo del mio elaborato: al termine di ognuno di essi è elencata la produzione scientifica che mi vede co-autore.

1 PATOLOGIE DA PORCINE CIRCOVIRUS TIPO 2 DEL 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 AGENTE EZIOLOGICO

Il Porcine Circovirus (PCV) è un membro della famiglia Circoviridae la quale presenta allo studio due generi: Circovirus e Gyrovirus. Il primo genere comprende: Beak and feather disease virus (BFDV), Swan circovirus, Duck circovirus, Finch circovirus, Gull circovirus, Goose circovirus, Pigeon circovirus, Starling circovirus, Porcine circovirus 1-2; il secondo genere invece annovera unicamente il Chicken anemia virus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>, accesso 20 giugno 2010).

Esso è il più piccolo virus in grado di replicare autonomamente in cellule di mammifero; è dotato di virione a simmetria icosaedrica, di diametro di circa 17 nm ed è privo di envelope.

Il suo genoma contiene materiale nucleare formato da un singolo filamento circolare di DNA (ssDNA), chiuso con legami covalenti, di circa 1,76 kb dal quale deriva il nome di “Porcine Circovirus” (PCV) (Tischer *et al.*, 1982).

Esso presenta allo studio due diversi tipi:

- Porcine Circovirus tipo 1 (PCV1) originariamente isolato come picornavirus-like contaminante persistente da una linea cellulare continua di rene suino PK/15 (Tischer *et al.*, 1982) e apatogeno (Tischer *et al.*, 1986);
- Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2): patogeno e isolato per la prima volta in Canada da suini affetti da un'emergente malattia multifattoriale che prese poi il nome di Post-weaning multisystemic syndrome (PMWS) (Allan *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1998).

Un'ulteriore conferma della presenza di entrambi i tipi di circovirus in suini malati si ebbe negli anni successivi ed in luoghi diversi: America del nord, Europa ed Asia (Allan *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 1998; Kiupel *et al.*, 1998; Hinrichs *et al.*, 1999).

Si dimostrò come i due tipi fossero delle entità distinte in grado di essere correlate a svariati quadri patologici (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998). Ciò portò i vari ricercatori a porre una maggiore attenzione al PCV2 senza tralasciare il PCV1. Infatti successivamente il PCV2 è stato identificato come agente eziologico necessario ma non sufficiente nel determinare numerosi quadri sindromici, definiti “Porcine Circovirus Associated Diseases” (PCVAD) in Nordamerica e “Porcine Circovirus Disease” (PCVD) in Europa (Segales *et al.*, 2005; Opriessnig *et al.*, 2007).

Solo recentemente il PCV1 e il PCV2 sono diventati 2 tipi virali distinti (Grau-Roma *et al.*, 2010).

Mentre i genomi di PCV1 e PCV2 sono costituiti da un numero di nucleotidi molto simile: 1759 per il PCV1 e 1767-1768 per il PCV2 (Mankertz *et al.*, 1997; Niagro *et al.*, 1998) continuano ad esserci numerose inserzioni e delezioni nell'intero genoma che tendono a tenere distinti i due tipi (Todd *et al.*, 2000). A livello del loro genoma pur essendo stati individuati 11 Open Reading Frames (ORF) teorici (Hamel *et al.*, 1998) solo tre sono le proteine codificate da tali ORF:

- ORF 1 o gene Rep, posto sul filamento positivo, che codifica per le replicasi Rep e Rep', rispettivamente costituite da 314 e 178 aminoacidi (Mankertz *et al.*, 1998; Cheung, 2003),
- ORF 2 o gene Cap situato sul filamento complementare, codificante l'unica proteina strutturale capsidica di 233-234 aminoacidi (Nawagitgul *et al.*, 2000),
- ORF 3, incompleto nel PCV1 (Mankertz *et al.*, 2004), localizzato sull'ORF1 antisenso, che codifica per una proteina non strutturale di 105 aminoacidi ad azione proapoptotica e la cui espressione è tardiva durante l'infezione cellulare (Liu *et al.*, 2005).

I genomi di PCV1 e PCV2 presentano un'altissima omologia nella sequenza di inizio replicazione e nel gene Rep (rispettivamente 79,5% e 82,0%) mentre ciò non è valido per il gene Cap.

E' proprio nella bassissima omologia di quest'ultimo pari solo al 62% (Mankertz *et al.*, 2004) che si ipotizza la differenza di patogenicità del PCV2 rispetto al PCV1; del resto tale gene è molto variabile in quanto costantemente esposto alla pressione selettiva esercitata dal sistema immunitario dell'ospite (Olvera *et al.*, 2007).

Inoltre non va dimenticato che essendo un virus a DNA monocatenario molto piccolo esso è, al pari dei virus a RNA monocatenario, quello che più facilmente si presta a mutazioni (Duffy *et al.*, 2008): il tasso di mutazione/sito/anno è stato stimato essere pari a $1,2 \times 10^{-3}$, il più alto valore finora noto per un virus a DNA monocatenario (Firth *et al.*, 2009).

L'omologia genetica è relativamente elevata anche all'interno dei vari ceppi di PCV2 (Mankertz *et al.*, 2000; Meehan *et al.*, 2001; Laroche *et al.*, 2002). Le prime analisi filogenetiche hanno dimostrato che virus isolati da diversi ambiti geografici appartenevano a diversi genocluster (Hamel *et al.*, 1998; Fenaux *et al.*, 2000; Mankertz *et al.*, 2000; Meehan *et al.*, 2001). Successivamente, attraverso studi sulle sequenze geniche, aminoacidiche o tramite enzimi di restrizione (restriction fragment length polymorphism), sono stati identificati due genogruppi chiamati genotipo 1 e 2 in Europa e PCV2a e PCV2b in Nord America. Attualmente la nomenclatura riconosciuta è quella nordamericana con la corrispondenza tra PCV2a e genotipo 2 da una parte e PCV2b e genotipo 1 dall'altra (Segales *et al.*, 2008). Di recente è stato isolato un terzo genotipo in uno studio retrospettivo danese ed è stato chiamato PCV2c (Dupont *et al.*, 2008).

Si è scoperto che il PCV2c era presente sul territorio danese negli anni '80, il PCV2a durante gli anni '90 e il PCV2b dal biennio 2001/2002 ad oggi (Dupont *et al.*, 2008); tale evidenza indica uno *shift* genotipico negli anni; ciò è confermato anche da numerosi studi epidemiologici effettuati in varie parti del mondo (Allan *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2007; Gagnon *et al.*, 2007; Takahagi *et al.*, 2008; Chiarelli Neto *et al.*, 2009). Sono stati evidenziati anche diversi ceppi di PCV2 nello stesso ospite: a seguito della coinfezione si ipotizza uno *shift* genotipico tra PCV2a e PCV2b (Hesse *et al.*, 2008; Cheung, 2009). A seguito dell'utilizzo di anticorpi monoclonali e

policlonali, pur essendo stati evidenziati diversi fenotipi antigenici, comunque è stata riscontrata la presenza di una protezione crociata tra genotipi (Opriessnig *et al.*, 2008).

1.3 PATOLOGIE ASSOCIATE AL PCV2

Anche se la maggior parte delle infezioni che vedono il coinvolgimento di PCV2 sono da ritenersi subcliniche (Segales *et al.*, 2005) comunque il suo ruolo di patogeno è stato verificato ed associato a più forme patologiche del suino ora identificate dall'acronimo PCVDs (porcine circovirus diseases) quali:

- la sindrome multisistemica del deperimento post-svezzamento (*Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome* - PMWS),
- la sindrome dermatite nefrite (*Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome* - PDNS) (Meehan *et al.*, 2001; Rosell *et al.*, 2000),
- il complesso delle malattie respiratorie del suino (*Porcine Respiratory Disease Complex* -PRDC) (Kim *et al.*, 2003): tra cui da annoverare la *Proliferative and Necrotizing Pneumonia* - PNP) (Drolet *et al.*, 2003),
- la linfadenite necrotizzante e l'enterite granulomatosa (Harding, 2004; Chae, 2005, Ségales *et al.*, 2005),
- enterite associata al PCV-2 (Kim *et al.*, 2003),
- alcuni disordini della sfera riproduttiva (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001; Meehan *et al.*, 2001; West *et al.*, 1999),
- tremore congenito tipo IIA, legato ad infezione da PCV-2 verificatosi in una sola occasione (Kennedy *et al.*, 2003).

Nonostante l'evidente variabilità clinico-patologica (Opriessnig *et al.*, 2007) alcuni autori hanno cercato di classificare le manifestazioni causate da PCV2 in due grandi categorie: patologie pre-natali e post-natali (Chae, 2005).

Nonostante la PMWS non sia mai stata segnalata prima del 1991, studi retrospettivi hanno evidenziato l'infezione da PCV2 dal 1962 in Germania (Jacobsen *et al.*, 2009), dal 1970 nel Regno Unito (Grierson *et al.*, 2004), dal 1973 in Irlanda (Walker *et al.*, 2000) e dal 1985 in Canada e Spagna (Magar *et al.*, 2000; Rodriguez-Arriola *et al.*, 2003).

Oggi l'infezione da PCV2 è ubiquitaria a tal punto che non si trovano più allevamenti sieronegativi negli studi epidemiologici (Sala *et al.*, 2000; Larochelle *et al.*, 2003; López-Soria *et al.*, 2005; Grau Roma, 2009). Per contro la PMWS ha una bassa prevalenza, oscillante tra il 4 ed il 30% (Segales *et al.*, 2002). La posizione dell'Australia è interessante, dal momento che sicuramente presenta sia il virus sia l'infezione, ma a tutt'oggi è considerata esente da PMWS (Raye *et al.*, 2005).

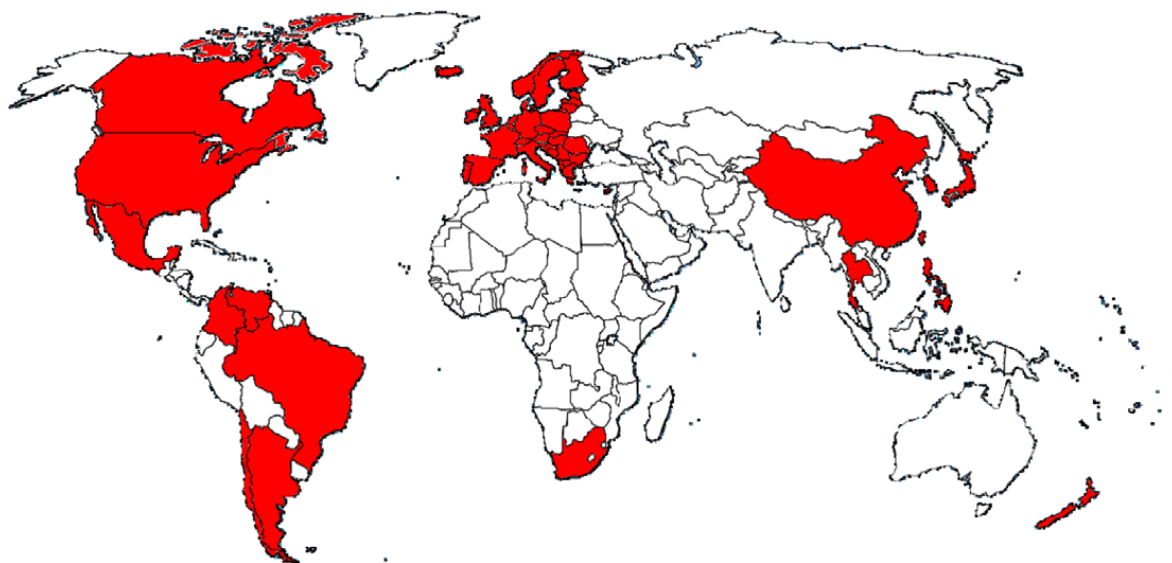


Figura 1.1 - Diffusione della PMWS a livello mondiale: gli stati con PMWS sono colorati in rosso. (da Grau Roma, 2009).

1.3.1 PMWS

La PMWS è sicuramente la patologia più studiata tra le PCVDs perché più clinicamente osservabile negli allevamenti suinicoli (Grau Roma, 2009).

Patologia dall'evoluzione cronica, testimoniata da un progressivo depauperamento delle condizioni generali di salute dei suini (riduzione dell'indice di conversione ed elevata percentuale di scarti in fase post-svezzamento) è caratterizzata da un andamento di morbilità e mortalità che procede ad episodi epidemici, endemici o sporadici (Harding, 2004) che in alcuni casi potrebbe sfociare anche in eventi letali: la letalità in alcuni casi può raggiungere anche picchi compresi tra il 70-80% (Segales *et al.*, 2002).

La PMWS pur potendosi verificare durante tutta la vita produttiva del suino colpisce soprattutto soggetti in un'età compresa fra 6^a e la 18^a settimana con un'incidenza massima fra l'8^a e la 12^a settimana (Sibila *et al.*, 2004; Grau Roma, 2009).



Foto 1.1 - Infezione sperimentale PCV2+PPV: tipico quadro di PMWS o PCVD sistemica (dimagrimento, abbattimento, ittero) (da Opriessnig *et al.*, 2007).

La malattia è stata segnalata per la prima volta in Canada nel 1996 e in seguito anche negli Stati Uniti d'America, in numerosi paesi asiatici e nella maggior parte dei paesi europei; la prima segnalazione in Italia risale al 1999 (Marcato *et al.*, 1999).

Va ricordato che anche se in tutti i casi di PMWS conclamata sia stata riscontrata la presenza di PCV2, questo virus è frequentemente presente anche in suini apparentemente sani. 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 (ADV), *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.

L'eziologia della PMWS é stata a lungo oggetto di discussione. Attualmente, l'analisi di casi spontanei e i tentativi di riproduzione sperimentale, spingono a sposare l'ipotesi che PCV2 sia il responsabile primario della PMWS. Tuttavia, sembra che altri agenti eziologici possano essere coinvolti nell'eziopatogenesi della malattia, ma non è ancora stato chiarito se esista una vera sinergia o interdipendenza tra questi agenti nel determinismo della sintomatologia e delle lesioni caratteristiche.

I sintomi della PMWS sono molto variabili e poco specifici.

Sei sono i segni clinici ritenuti necessari perché si possa fare diagnosi clinica di PMWS (Harding, 2004):

- deperimento (progressivo dimagrimento causato da astenia ed inappetenza),
- dispnea,
- linfadenomegalia (soprattutto dei linfonodi inguinali che diventano apprezzabili alla palpazione),

- diarrea,
- pallore,
- ittero.

Questi sintomi generalmente non sono riscontrabili contemporaneamente in un singolo animale, ma la maggior parte di essi si presenta negli allevamenti colpiti entro un certo periodo di tempo.

Altri segni clinici che possono riscontrarsi in diversi soggetti sono:

- tosse produttiva,
- piressia,
- ulcere gastriche,
- meningite,
- morti improvvise.

Di norma è interessata una percentuale variabile, dal 10% al 30% circa, degli animali presenti nella fase di post-svezzamento. La gravità dei sintomi e la mortalità sono condizionate dalle caratteristiche ambientali dell'allevamento, dal management aziendale e dai germi d'induzione secondaria. Tutti questi fattori possono intervenire aggravando e/o modificando il decorso della malattia (Opriessnig et al., 2007).

Riguardo alle modalità di contagio il PCV2 può essere trasmesso sia per via orizzontale (da suino a suino) sia per via verticale (dalla madre al feto). La presenza di PCV2 è stata rilevata in un gran numero di campioni biologici. Il virus è quindi in grado di trasmettersi da animale ad animale attraverso numerosi secreti ed escreti (feci, urine, scolo nasale, secreti tonsillari e bronchiali). La via principale di trasmissione del virus è probabilmente quella aerogena (il polmone e le vie respiratorie in generale sono tra gli organi di elezione del PCV2) e i suinetti sieronegativi di 8-9 settimane d'età rappresentano un facile bersaglio per la trasmissione orizzontale del virus, anche attraverso box contigui.

Le modalità con cui PCV2 si trasmette da allevamento ad allevamento non sono ancora del tutto chiare ma, come accade per altri virus, molto probabilmente il veicolo principale è la movimentazione degli stessi animali.

La possibilità di trasmissione verticale di PCV2 è stata oggi dimostrata ma non ne è ancora ben chiara la sua importanza (Segales *et al.*, 2004).

Il quadro necroscopico è aspecifico: i suinetti colpiti da PMWS presentano:

- una carcassa pallida (anemia) ed emaciata (cachessia, atrofia muscolare e del tessuto adiposo) (Segales *et al.*, 2004),
- linfonodi aumentati di volume soprattutto inguinali e meseraici (Marcato, 2002),
- polmoni di consistenza aumentata a causa di una polmonite interstiziale (Marcato, 2002),
- lesioni erosivo ulcerative della “pars oesophagea” della mucosa gastrica (Rosell *et al.*, 1999),
- talvolta lesioni emorragiche cutanee e renali (Rosell *et al.*, 1999),
- occasionalmente si possono osservare focolai di nefrite interstiziale (Marcato, 2002),
- fegato ridotto in dimensioni e moderatamente itterico con ispessimento ed evidenziazione del connettivo interlobulare (Marcato, 2002).

All'esame istopatologico sono presenti lesioni a carico di due compartimenti diversi: il tessuto linfoide e gli organi parenchimatosi (Krakowka *et al.*, 2005).

I linfonodi presentano una massiva disarchitettura dovuta ad una infiammazione granulomatosa (linfadenite macrofagico sinciziale) con presenza di istiociti, cellule giganti e multinucleate e grave deplezione linfocitaria; all'interno del citoplasma dei macrofagi e delle cellule dendritiche si apprezzano, solo nell'1% circa dei casi, corpi inclusi basofili tondeggianti di 2-15 micrometri (Rosell *et al.*, 1999; Marcato, 2002). Le placche del Peyer, le tonsille, la milza, il BALT e il

timo presentano infiltrazione ad opera di istiociti, cellule epitelioidi ed eventualmente cellule giganti con corpi inclusi citoplasmatici (Rosell *et al.*, 1999). Le cellule dendritiche, gli istiociti e talvolta i linfociti dei tessuti linfoidi manifestano un'intensa positività immunoistochimica per PCV2 a livello citoplasmatico (Rosell *et al.*, 1999). Dal momento che le lesioni possono variare da lievi a molto gravi, è stato proposto uno “scoring system” delle lesioni del tessuto linfoide date dal PCV2:

- 0: normale,
- 1: lieve deplezione linfatica che interessa tutte le tipologie cellulari,
- 2: moderata deplezione linfatica,
- 3: grave deplezione linfatica con perdita della struttura linfatica follicolare (Opriessnig *et al.*, 2004).

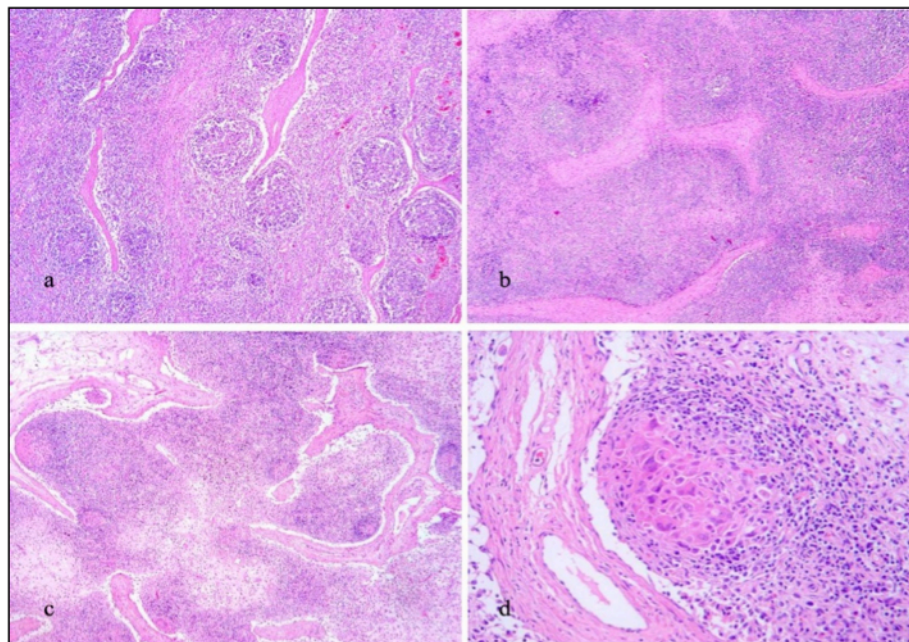


Foto 1.2 - Suino. Linfonodo inguinale superficiale. a) aspetto istologico normale: presenza di follicoli linfatici e tessuto interfollicolare, (EE, 5X); b) PMWS: grave deplezione linfoide con scomparsa dei follicoli e rarefazione cellulare del tessuto interfollicolare, (EE, 5X); c) PMWS: granulomi epitelioidi centrati su follicoli e rarefazione cellulare del tessuto interfollicolare, (EE, 5X); d) PMWS: particolare dell'immagine precedente: granuloma epitelioide centrofollicolare, (EE, 20X). (da Sarli *et al.*, 2008).

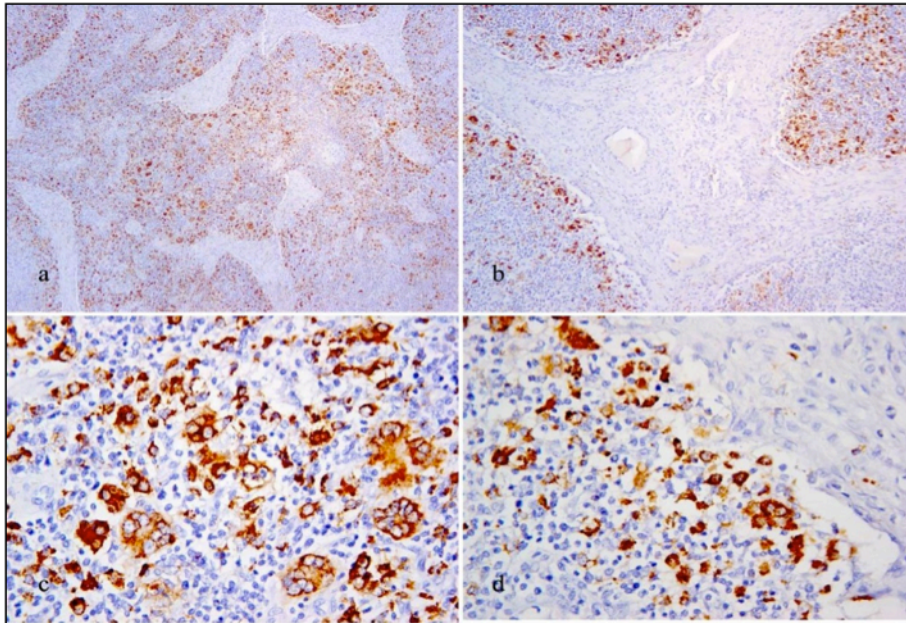


Foto 1.3 - Suino. Linfonodo inguinale superficiale. PMWS. Reazione immunohistochemica per PCV2. Positività citoplasmatica per PCV2 nel tessuto linfoide depleto, distribuita in maniera diffusa (a) 10X e particolare in c, 40X) o concentrata in macrofagi nei seni peritrabecolari (b), 10X e particolare in d, 40X). (da Sarli *et al.*, 2008).

Altri organi possono essere coinvolti, anche se spesso in maniera meno evidente, come i polmoni, il fegato ed i reni, che mostrano lesioni infiammatorie di tipo interstiziale riscontrabili con frequenza maggiore nel polmone rispetto agli altri organi (Chae, 2004; Segales *et al.*, 2005). Infatti, l'esame istopatologico dei polmoni evidenzia quadri di polmonite interstiziale multifocale con setti ispessiti ad opera di mononucleati; talvolta i macrofagi contengono corpi inclusi citoplasmatici come quelli già descritti nei tessuti linfoidi. Possono sovrapporsi a tali lesioni quadri di broncopolmonite o pleurite come conseguenza di proliferazione di batteri di irruzione secondaria (Rosell *et al.*, 1999; Marcato, 2002). Si può rilevare inoltre edema settale interlobulare (Grau Roma, 2009). L'antigene virale è evidenziato all'interno delle cellule epiteliali alveolari, bronchiali e bronchiolari, altresì è presente nelle ghiandole bronchiali, nei leiomiociti vascolari e nell'essudato infiammatorio intraluminale e interstiziale (Rosell *et al.*, 1999).

Nel fegato invece è presente un caratteristico infiltrato linfoistiocitario di varia intensità negli spazi portobiliari con estensione intralobulare. Quadri di degenerazione e necrosi epatocitaria

sembrano essere lesioni ancillari conseguenza dell'alterato trofismo portale. La tecnica immunohistochimica consente di evidenziare l'antigene del PCV2 soprattutto a livello del citoplasma e in alcuni casi anche nei nuclei degli epatociti delle zone centroacinose; inoltre la reazione è positiva anche nelle cellule dell'albero biliare, nelle cellule del Kupffer e nei mononucleati dell'infiltrato (Rosell *et al.*, 1999; Marcato, 2002).

Anche nel rene si rilevano aree diffuse o multifocali d'infiltrato linfo-istiocitario del tessuto peripelvico che appare edematoso e desmoplastico. Vasculiti diffuse o multifocali sono inoltre un reperto frequente in queste aree. Le lesioni corticali spaziano dall'atrofia multifocale tubulare alla necrosi dei tubuli associata a edema, proliferazione fibrosa e nefrite interstiziale (Sarli *et al.*, 2008). Solitamente l'antigene virale a livello renale viene riscontrato sia nelle pareti delle arterie glomerulari sia in maniera maggiore nel citoplasma delle cellule epiteliali tubulari e dei fagociti mononucleati (Rosell *et al.*, 1999; Marcato, 2002).

Nel caso di un interessamento del tratto gastrointestinale si riscontrano edema e ulcere della "pars-esofagea" dello stomaco e riduzione dello spessore delle pareti intestinali (soprattutto dell'ileo e del colon spirale) che risultano essere ripieni di liquido. Istologicamente si osserva atrofia dei villi intestinali con infiltrazione linfo-istiocitaria transmurale. Antigene di PCV2 può essere riscontrato nelle cellule epiteliali della mucosa, nei fagociti della lamina propria e della sottomucosa nonché nei gangli linfatici intestinali. Sebbene il pancreas sia un organo non molto colpito da tale patologia, in alcuni casi è possibile riscontrare istologicamente atrofia o rigenerazione dell'epitelio degli acini e dei duttuli associati ad infiltrazione linfo-istiocitaria (Rosell *et al.*, 1999).

Numerose indagini hanno dimostrato che in Italia, analogamente a quanto accade in altri paesi, l'infezione da PCV2 è molto diffusa. Scarse sono invece le informazioni concernenti la 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 corretta diagnosi di PMWS richiede, infatti, 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 rimescolamenti tra 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 a evidenziare la presenza di PCV2 all'interno delle lesioni caratteristiche (Segales 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, quindi, protocolli diagnostici non corretti, potrebbero portare alla mancata messa in evidenza di problematiche sanitarie legate all'infezione con PCV2, riducendo drasticamente la possibilità di implementare efficaci misure di controllo.

1.3.2 PDNS

La PDNS è una sindrome dall'andamento sporadico che può colpire varie classi produttive (suinetti, magroni o scrofette da rimonta) (Thompson *et al.*, 2000; Chae, 2005) soprattutto tra la 5^a e la 12^a settimana di età (Smith *et al.*, 1993; White *et al.*, 1993) dall'esito raramente infausto. Si discute ancora riguardo all'eziologia della malattia, anche se negli ultimi anni, la continua dimostrazione di antigene virale e DNA di PCV2 a livello delle lesioni, depone a favore di questo virus come agente causale. Ipotesi simili invece riconoscono l'associazione di PCV2 alla patologia ma non identificano il virus come agente eziologico esclusivo del quadro morboso associando quest'ultimo anche a infezioni da PRRSV, *Pasteurella multocida* e *Streptococcus sp.* (Drolet *et al.*, 1999). Più recenti ipotesi imputano la vasculite a un meccanismo immunopatologico di III tipo o ad una copiosa replicazione del PCV2 a livello endoteliale (Wellenberg *et al.*, 2004; Langohr *et al.*, 2010).

Essa si manifesta clinicamente con presenza di macule e papule cutanee di colore rosso o porpora che possono tendere a confluire formando placche. Tali lesioni coinvolgono inizialmente il quarto posteriore e l'addome per poi interessare anche il torace e i padiglioni auricolari. Con il progredire della malattia le lesioni cutanee si coprono di croste scure che cadono gradualmente spesso lasciando cicatrici (Drolet *et al.*, 1999).

Altri sintomi sono rappresentati da vario grado di depressione del sensorio e piressia.



Foto 1.4 - Lesioni cutanee eritematose da PDNS (da Duran *et al.*, 1997).



Foto 1.5 - Particolare della lesione cutanea della foto 4 (da Duran *et al*, 1997).

Al tavolo anatomopatologico è possibile apprezzare sia le lesioni cutanee sopra citate sia la presenza di un rene aumentato di volume, pallido e con presenza di petecchie corticali diffuse. Istologicamente la malattia è caratterizzata da quadri di glomerulonefrite acuta essudativa extracapillare e da vasculite necrotizzante sistemica da immunocomplessi soprattutto a carico di vasi cutanei e sottocutanei (Drolet *et al.*, 1999). Si riscontrano inoltre lesioni a carico di altri organi quali: stomaco e intestino (ulcere con conseguenti emorragie gastrointestinali), polmone (pleuriti croniche e broncopolmonite catarrale), cuore (pericardite con aderenze fibrose) e cervello (emorragie multiple delle leptomeningi cerebellari associate a vasculiti linfocitarie e degenerazione fibrinoide dei vasi cerebellari e delle aree periventricolari).

1.3.3 PRDC

Il cosiddetto complesso delle malattie respiratorie rappresenta un serio problema sanitario nell'allevamento suinicolo nelle fasi produttive dell'ingrasso e del finissaggio (tra la 16^a e la 22^a settimana).

All'interno di questo complesso va citata la polmonite proliferativa necrotizzante (Proliferative Necrotizing Pneumonia-PNP) che riconosce nel PCV2 un importante cofattore (Drolet *et al.*, 1999; Chae, 2005; Morandi *et al.*, 2010).

Gli altri agenti eziologici coinvolti sono: PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida* (Chae, 2005).

Clinicamente si rilevano depressione del sensorio fino a condizioni di letargia, anoressia, dispnea, tosse, ridotti incrementi ponderali e indici di conversione insoddisfacenti (Halbur *et al.*, 1998; Thacker *et al.*, 1998).

Macroscopicamente di solito la PRDC si manifesta con quadri di polmonite interstiziale; sono possibili quadri di polmonite cronica essudativa a distribuzione cranioventrale, in associazione con broncopolmonite o polmonite enzootica (Rosell *et al.*, 1999; Marcato, 2002; Sarli *et al.*, 2009). Le lesioni evidenziabili all'esame istopatologico sono date da una polmonite interstiziale con fibrosi peribronchiale e peribronchiolare. I setti alveolari appaiono ispessiti dall'infiltrato macrofagico e linfoplasmocitario. Molti setti alveolari sono delineati da alveolociti secondari iperplasici (epitelizzazione alveolare) e si ritrova materiale necrotico in ambito intraluminale (Marcato, 2002; Sarli *et al.*, 2009). Talvolta il quadro depone per una polmonite proliferativa necrotizzante, caratterizzata da un'intensa iperplasia degli pneumociti e un'importante necrosi dei macrofagi settali ed intraalveolari (Chae, 2005; Sarli *et al.*, 2009).

1.3.4 PNP

La polmonite proliferativa e necrotizzante é una patologia del suino in svezzamento e post-svezzamento con un picco d'incidenza fra la 4^a e la 16^a settimana.

La PNP è oggi inserita fra le PCVDs del suino (Harding, 2004; Segalés *et al.*, 2004).

L'eziologia non è ancora ben chiara. Il primo agente chiamato in causa in studi canadesi è stato il virus dell'influenza suina (*Swine Influenza Virus - SIV*) (Morin *et al.*, 1990; Austin and Bystrom, 1991; Dea *et al.*, 1992; Girard *et al.*, 1992). Larochelle insieme con altri autori nel 1994 ipotizzò 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 fu evidenziato nessun agente eziologico conosciuto. In seguito, gli stessi Autori americani (Drolet *et al.*, 2003) ed altri Autori europei (Pesch *et al.*, 2000; Grau-Roma and Segalés, 2007) hanno evidenziato, anche se con qualche differenza, una frequente coesistenza dei due virus (PRRSV e PCV2) in polmoni con PNP. 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 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 e un ruolo diverso dei virus considerati nell'insorgenza della PNP nei due differenti contesti continentali, lasciano ancora molti spazi di approfondimento e di studio.

Macroscopicamente, tale malattia è caratterizzata da un aumento di consistenza dei polmoni che non collassano e mostrano un colore dal rosso-bruno al grigiastro con lesioni prevalentemente

localizzate nei lobi craniali e medi e nelle porzioni cranio-ventrali dei lobi caudali (Morin *et al.*, 1990).

I reperti istologici mostrano materiale necrotico e detriti cellulari intralveolari e un diverso grado d'iperplasia e ipertrofia dei pneumociti di II tipo (Morin *et al.*, 1990; Larochelle *et al.*, 1994; Drolet *et al.*, 2003; Segalés *et al.*, 2004). Questi due aspetti si rilevano costantemente in un contesto di polmonite interstiziale di varia gravità con presenza o meno di bronchiolite necrotizzante e/o broncopolmonite che ne complicano il quadro.

1.3.5 Linfadenite necrotizzante

La linfadenite necrotizzante si manifesta con una serie aspecifica di sintomi quali incoordinazione motoria, febbre e diarrea accompagnata da una crescita stentata dei soggetti; l'unico rilievo peculiare è una decisa linfadenomegalia inguinale (Chae, 2005).

La lesione istopatologica che si riscontra con maggiore frequenza è la necrosi dei follicoli linfoidi: si apprezzano da foci necrotici di 1-10 cellule a lesioni molto più evidenti con diffusa picnosi e carioressi.

E' possibile individuare il genoma e l'antigene del PCV2 in questi foci necrotici, ma il meccanismo patogenetico di questa lesione non è ancora chiaro (Chae, 2005; Opriessnig *et al.*, 2007).

1.3.6 Enterite granulomatosa associata al PCV2

L'enterite granulomatosa è un'altra manifestazione clinica dell'infezione da PCV2 che riconosce una morbilità del 10-20% e una letalità del 50-60% (Chae, 2005) dal momento che la terapia antibiotica non ha nessuna azione curativa.

Clinicamente si rilevano quadri di diarrea inizialmente di colore giallastro che vira al nero accompagnata da un sensibile ritardo nell'accrescimento dell'animale.

Tale forma di enterite, associata a PCV2, macroscopicamente è simile all'ileite cronica da *Lawsonia intracellularis*; la mucosa intestinale è ispessita e i linfocetri meseraici sono megalici.

L'esame istopatologico rivela un'enterite granulomatosa accompagnata da un'importante deplezione linfocitaria delle placche del Peyer del piccolo e grosso intestino; tale

immunodepressione mucosale funge da porta d'ingresso nei confronti di patogeni opportunisti (Kim *et al.*, 2004). Sono presenti numerosi istiociti epitelioidi e cellule giganti multinucleate con tipici corpi inclusi da PCV2, rivelati anche da indagine immunoistochimica e da ibridazione in situ (Chae, 2005; Opriessnig *et al.*, 2007).

1.3.7 Disordini riproduttivi

Numerosi sono i disordini riproduttivi causati da PCV-2 in virtù della ormai associata trasmissione transplacentare (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001).

I disordini più facilmente riscontrati sono (West *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2001; Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001; Josephson and Charbonneau, 2001; Kim *et al.*, 2004; Chae, 2005):

- riassorbimento embrionale precoce,
- mummificazione fetale,
- aborto,
- natimortalità (nascita di soggetti prematuri, dismaturi o disvitali).



Foto 1.6 - Quadro di mummificazione fetale da PCV2: si noti la diversa età gestazionale dei feti colpiti (da Opriessnig *et al.*, 2007).

Il cuore è il bersaglio primario di replicazione del virus nel feto, infatti al tavolo anatomopatologico

i feti abortiti presentano tipiche lesioni soprattutto cardiache (aumento di volume, estese aree di degenerazione, necrosi) e istologicamente lieve fibrosi o un infiltrato di mononucleati moderato ma diffuso a carico del miocardio. Talvolta sono riportati quadri di ascite, idrotorace, idropericardio, edema e congestione conseguenza di un'insufficienza cardiaca (Madson *et al.*, 2009).

Si possono rilevare anche quadri di polmonite interstiziale con moderato infiltrato di cellule mononucleate (West *et al.*, 1999; Chae, 2004; Opriessnig *et al.*, 2007).

1.3.8 Epidermite essudativa o Greasy pig disease

L'epidermite essudativa è una patologia che colpisce in modo grave soprattutto i suinetti tra il 5° e il 35° giorno di vita, sebbene quadri più lievi colpiscano soggetti di tutte le età. La morbilità può variare dal 10% al 100%; la prognosi è meno fausta nei soggetti più giovani e la letalità si attesta tra il 5% e il 90%, con una media del 25% (Chae, 2005).

Si tratta di una forma di dermatite seborroica o pioderma acuto spesso fatale causato da un batterio saprofita cutaneo ubiquitario (*Staphylococcus hyicus*). La presenza di PCV2 e PPV suino nelle cellule infiammatorie delle lesioni cutanee, accertata con la “ibridazione in situ”, dimostra, in molti casi, la coinfezione con questi virus in tale patologia (Chae, 2005).

La cute dei soggetti colpiti appare untuosa e imbrattata: ciò in molti casi può essere testimoniato dalla percezione di un odore pungente (Tanabe *et al.*, 1996).

Si tratta di una dermatite seborroica generalizzata o localizzata dal decorso variabile (iperacuto, acuto, subacuto o cronico).

Mentre il quadro iperacuto può portare a morte i suinetti senza segni premonitori (Chae, 2005) la forma acuta si caratterizza per la presenza di macule rossastre a livello di giunzioni mucocutanee, che evolvono in vescicole o pustole che lasciano il posto a croste che possono cadere e permettere la guarigione. Nei soggetti più anziani tale malattia non solo si manifesta con la presenza di rare papule a livello di testa ma ha anche di solito una prognosi fausta.

Produzione scientifica personale

- Laura Fusaro, Federico Morandi, **Domenico Ferrara**, Giorgio Leotti, Giuseppe Sarli, Fabio Ostanello: “Ruolo del porcine circovirus tipo 2 (PCV2) nella patologia riproduttiva del suino”, *Summa Animali da Reddito*, 2009, 7, 23-27.

Bibliografia

- Allan G.M., McNeilly F., Kennedy S., Daft 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 (1):3-10.
- Allan G.M., McNeilly F., McMenemy M., McNair I., Krakowka S.G., Timmusk S., Walls D., Donnelly M., Minahin D., Ellis J., Wallgren P., Fossum C. (2007) "Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland." *J Vet Diagn Invest.* 19 (6):668-73.
- Austin R., Bystrom J. (1991) "Proliferative and necrotizing pneumonia in Manitoba". *Can Vet J.* 32: 371.
- Chae C. (2004) "Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology". *Vet J.* 168 (1): 41-49.
- Chae C. (2005) "A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases". *Vet J.*, 169 (3): 326-336.
- Cheung A.K. (2003) "Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses." *Virology.* 310 (1):41-49.
- Cheung A.K., Lager K.M., Kohutyuk O.I., Vincent A.L., Henry S.C., Baker R.B., Rowland R.R., Dunham A.G. (2007) "Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds." *Arch Virol.* 152 (5):1035-1044.

- Cheung A.K. (2009) “Homologous recombination within the capsid gene of porcine circovirus type 2 subgroup viruses via natural co-infection.” *Arch Virol.* 154 (3):531-534.
- Chiarelli-Neto O., Yotoko K.S., Vidigal P.M., Silva F.M., Castro L.A., Fietto J.L., Silva A. Jr., Almeida M.R. (2009) “Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches.” *Virus Res.* 140: 57-63.
- 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., 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.
- 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 (2): 143-148.
- Duffy S., Shackelton L.A., Holmes E.C. (2008) “Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants”. *Nat Rev Genet.* 9 (4):267-76.
- Dupont K., Nielsen E.O., Baekbo P., Larsen L.E. (2008) “Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time.” *Vet Microbiol.* 128: 56-64.
- Duran CO, Ramos-Vara JA, Render JA. (1997) “Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: A new condition to include in the differential diagnosis list for skin discoloration in swine.” *J Swine Health Prod.* 5 (6): 241-244.

- Ellis J., Hassard L., Clark E., Harding J., Allan G., Willson P., Strokappe J., Martin K., McNeilly F., Meehan B., Todd D., Haines D. (1998). "Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome". *Can Vet J.* 39 (1): 44-51.
- Fenaux M., Halbur P.G., Gill M., Toth T.E., Meng X.J. (2000) "Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2." *J Clin Microbiol.* 38 (7): 2494-2503.
- Firth C., Charleston M.A., Duffy S., Shapiro B., Holmes E.C. (2009) "Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2." *J Virol.* 83 (24): 12813-12821.
- Gagnon C.A., Tremblay D., Tijssen P., Venne M.H., Houde A., Elahi S.M. (2007) "The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada." *Can Vet J.* 48 (8): 811-819.
- Girard C., Morin R., El Alzhary Y. (1992) "Experimentally induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia with an influenza A virus". *Vet Rec.* 130: 206-207.
- Grau Roma L. (2009) "New insights into the epidemiology of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)" Phd Thesis Facoltà di Veterinaria- Università Autonoma Barcellona.
- 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 Microbiol.* 119: 144-151.

- Grau Roma L., Fraile L., Segales J. (2010) "Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2." *Vet J.* In Press
- Grierson S.S., King D.P., Wellenberg G.J., Banks M. (2004) "Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study." *Res Vet Sci.* 77 (3): 265-268.
- Halbur P.G., Sorden S.D., Lager K.M. (1998) "Evaluation of the pathogenicity of "atypical PRRS" virus isolates in caesarean-derived-colostrum-deprived (CDCD) pigs" *Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July*, 136.
- Hamel A.L., Lin L.L., Nayar G.P. (1998). "Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs". *J Virol.* 72 (6): 5262-5267.
- Harding J.C.S. (2004) "The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2". *Veterinary Microbiology*, 98 (2), 131-135.
- Hesse R., Kerrigan M., Rowland R.R. (2008): "Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field". *Virus Res*, 132 (1-2): 201-207.
- Hinrichs U., Ohlinger V.F., Pesch S. (1999). "First report of porcine circovirus type 2 infection in Germany". *Tieraerztl Umsch* 54: 255-258.
- Jacobsen B., Krueger L., Seeliger F., Bruegmann M., Segalés J., Baumgaertner W. (2009) "Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany." *Vet Microbiol.* 138 (1-2): 27-33.

- Josephson G., Charbonneau G. (2001) "Case report of reproductive problems in a new startup operation." *J Swine Health Prod.* 9:258-259.
- Kennedy S., Allan G., McNeilly F., Adair B.M., Hughes A., Spillane P. (1998). "Porcine circovirus infection in Northern Ireland". *Vet Rec.* 142 (18): 495-496.
- Kennedy S., Segalés J., Rovira A., Scholes S., Domingo M., Moffett D., Meehan B., O'Neill R., McNeilly F., Allan G. (2003) "Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors." *J Vet Diagn Invest.* 15 (2): 151-156.
- Kim J., Chung H., Chae C. (2003) "Association of porcine circo virus 2 with porcine respiratory disease complex." *Vet J.* 166: 251-256.
- 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 (4): 303-307.
- Krakowka S., Ellis J., McNeilly F., Waldner C., Allan G. (2005) "Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome." *J Vet Diagn Invest.* 17 (3): 213-222.
- 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 (24): 759-760.
- Langohr I.M., Stevenson G.W., Nelson E.A., Lenz S.D., HogenEsch H., Wei H., Pogranichniy R.M. (2010) "Vascular lesions in pigs experimentally infected with porcine circovirus type 2 serogroup B." *Vet Pathol.* 47 (1): 140-7.

- Laroche 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.
- Laroche R., Magar R., D'Allaire S. (2002) "Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions." *Virus Res.* 90 (1-2): 101-112.
- Laroche R., Magar R., D'Allaire S. (2003) "Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome." *Can J Vet Res.* 67 (2): 114-120.
- Liu J., Chen I., Kwang J. (2005) "Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis." *J Virol.* 79 (13): 8262-8274.
- López-Soria S., Segalés J., Rose N., Viñas M.J., Blanchard P., Madec F., Jestin A., Casal J., Domingo M. (2005) "An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain." *Prev Vet Med.* 69 (1-2): 97-107.
- Madson D.M., Patterson A.R., Ramamoorthy S., Pal N., Meng X.J., Opriessnig T. (2009) "Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2." *Vet Pathol.* 46: 707-716.
- Magar R., Müller P., Laroche R. (2000) "Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2." *Can J Vet Res.* 64 (3): 184-186.

- Mankertz A., Persson F., Mankertz J., Blaess G., Buhk H.J. (1997) "Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus." *J Virol.* 71 (3): 2562-2566.
- Mankertz J., Buhk H.J., Blaess G., Mankertz A. (1998) "Transcription analysis of porcine circovirus (PCV)." *Virus Genes.* 16 (3): 267-276.
- Mankertz A., Domingo M., Folch J.M., LeCann P, Jestin A, Segalés J., Chmielewicz B., Plana-Durán J., Soike D. (2000) "Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France." *Virus Res.* 66 (1): 65-77.
- Mankertz A., Caliskan R., Hattermann K., Hillenbrand B., Kurzendoerfer P., Mueller B., Schmitt C., Steinfeldt T., Finsterbusch T. (2004) "Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication." *Vet Microbiol.* 98 (2): 81-88.
- 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.
- Marcato P.S. (2002). Sistema Respiratorio. In "*Patologia Sistematica Veterinaria*" 1° Ed. Edagricole, Bologna. Pag. 558-559.
- Meehan B.M., McNeilly F., Todd D., Kennedy S., Jewhurst V.A., Ellis J.A., Hassard L.E., Clark E.G., Haines D.M., Allan G.M. (1998). "Characterization of a novel circovirus DNA's associated with wasting diseases syndromes in pigs". *J Gen Virol* 79: 2171-2179.
- Meehan B.M., McNeilly F., McNair I., Walker I., Ellis J.A., Krakowka S., Allan G.M. (2001) "Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases

- of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome.” *Arch Virol.* 146 (4): 835-842.
- 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 aetiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in Italian pigs” *J Comp Pathol.* 142 (1): 74-78.
 - Morin M., Girard C., Eiazhary Y., Fajardo R., Drolet R., Lagacé A. (1990) “Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease”. *Can Vet J.* 31: 837-839.
 - Nawagitgul P., Morozov I., Bolin S.R., Harms P.A., Sorden S.D., Paul P.S. (2000) “Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein.” *J Gen Virol.* 81: 2281-2287.
 - Niagro F.D., Forsthoefel A.N., Lawther R.P., Kamalanathan L., Ritchie B.W., Latimer K.S., Lukert P.D. (1998) “Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses.” *Arch Virol.* 143 (9): 1723-1744.
 - O’Connor B, Gauvreau H, West K, Bogdan J, Ayroud M, Clark EG, Kiniby C, Allan G, Ellis JA. (2001) “Multiple porcine circovirus 2-associated abortion and reproductive failure in a multisite swine production unit” *Can Vet J.* 42 (7): 551-553.
 - Olvera A., Cortey M., Segales J. (2007) “Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality.” *Virology* 357 (2): 175–185.
 - Opriessnig T., Thacker E.L, Yu S., Fenaux M., Meng X.J., Halbur P.G. (2004) “Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in

- pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2.” *Vet Pathol.* 41 (6): 624-640.
- Opriessnig T., Meng X.J., Halbur P.G. (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., Ramamoorthy S., Madson D.M., Patterson A.R., Pal N., Carman S., Meng X.J., Halbur P.G. (2008) “Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection.” *J Gen Virol.* 89: 2482-2491.
 - 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.
 - Raye W., Muhling J., Warfe L., Buddle J.R., Palmer C., Wilcox G.E. (2005) “The detection of porcine circovirus in the Australian pig herd.” *Aust Vet J.* 83 (5): 300-304.
 - Rodríguez-Arrijoja G.M., Segalés J., Rosell C., Rovira A., Pujols J., Plana-Durán J., Domingo M. (2003) “Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain.” *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 50 (2): 99-101.
 - Rosell C., Segales J., Plana-Duran J., Balasch M., Rodríguez-Arrijoja G.M., Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S., Domingo M. (1999) “Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural

- cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs.” *J Comp Pathol.* 120: 59–78.
- Rosell C., Segalés J., Ramos-Vara J.A., Folch J.M., Rodríguez-Arrijo G.M., Duran C.O., Balasch M., Plana-Durán J., Domingo M. (2000) “Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome.” *Vet Rec.* 146 (2): 40-43.
 - 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.
 - 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 postweaning multisystemic wasting syndrome in Italy”. *Vet Rec.* 164 (17): 519-523.
 - Segalés J., Calsamiglia M., Rosell C., Soler M., Maldonado J., Martín M., Domingo M. (2002) “Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain.” *Vet Microbiol.* 85 (1): 23-30.

- Segalés J., Rosell C., Domingo M. (2004) "Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease". *Vet. Microbiol.* 98 (2): 137-149
- Segalés J., Allan G.M., Domingo M. (2005). "Porcine circovirus diseases". *Animal Health Research Review* 6, 119-142.
- Segalés 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., Grassland B., Baekbo P., Allan G. (2008) "PCV-2 genotype definition and nomenclature." *Vet Rec.* 162 (26): 867-868.
- Sibila M., Calsamiglia M., Segalés J., Blanchard P., Badiella L., Le Dimna M., Jestin A., Domingo M. (2004) "Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome." *Am J Vet Res.* 65 (1): 88-92.
- Smith W.J., Thomson J.R., Done S. (1993) "Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs." *Vet Rec.* 132 (2): 47.
- Takahagi Y., Nishiyama Y., Toki S., Yonekita T., Morimatsu F., Murakami H. (2008) "Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis." *J Vet Med Sci.* 70 (6): 603-606.
- Tanabe T., Sato H., Watanabe K., Hirano M., Hirose K., Kurokawa S., Nakano K., Saito H., Maehara N. (1996) "Correlation between occurrence of exudative epidermitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus hyicus*." *Vet Microbiol.* 48: 9-17.

- Thacker EL, Halbur PG, Paul PS, Thacker BJ. (1998) "Detection of intracellular porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in porcine macrophages by flow cytometry." *J Vet Diagn Invest* 10 (3):308-311.
- Thompson, J., Smith, B., Allan, G., McNeilly, F., McVicar, C. (2000) "PDNS, PMWS and porcine circovirus type 2 in Scotland." *Vet. Rec.* 146, 651-652.
- Tischer I., Gelderblom H., Vettermann W., Koch M.A. (1982) "A very small porcine virus with circular single-stranded DNA." *Nature.* 295 (5844): 64-66.
- Tischer I., Miels W., Wolff D., Vagt M., Griem W. (1986) "Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus." *Arch Virol.* 91 (3-4): 271-276.
- Todd D. (2000) "Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review." *Avian Pathol.* 29 (5): 373-394.
- Walker I.W., Konoby C.A., Jewhurst V.A., McNair I., McNeilly F., Meehan B.M., Cottrell T.S., Ellis J.A., Allan G.M. (2000) "Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2." *J Vet Diagn Invest.* 12 (5): 400-405.
- Wellenberg G.J., Stockhofe-Zurwieden N., de Jong M.F., Boersma W.J., Elbers A.R. (2004) "Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study." *Vet Microbiol.* 99 (3-4):203-214.
- 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 (6): 530-532.

- White M, Higgins RJ: (1993) "Dermatitis nephropathy syndrome of pigs. "Vet Rec 132: 199.

Sitografia

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>

2 RISULTATI SULL'IMPIEGO DI UN PROTOCOLLO DIAGNOSTICO PER LA VALUTAZIONE DEL COINVOLGIMENTO DEL PCV2 NELLA PATOLOGIA RIPRODUTTIVA DEL SUINO

2.1 INTRODUZIONE

A partire dal 1998 quando il PCV2 fu associato alla PMWS, il suo coinvolgimento è stato riconosciuto in numerose altre forme patologiche del suino, tutte identificate con l'acronimo PCVDs (Chae, 2005; Segalés *et al.*, 2005). In seguito, il PCV2 è stato considerato anche responsabile di patologie della sfera riproduttiva (West *et al.*, 1999; Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2001; Corradi *et al.*, 2004).

L'ampia diffusione dell'infezione e l'assenza di un rapporto diretto causa-effetto fra presenza del virus e manifestazioni patologiche, hanno elevato i test *in situ* (immunoistochimica-IHC e ibridazione in situ-ISH), che permettono di dimostrare la presenza del virus nel contesto delle lesioni istologiche (Brunborg *et al.*, 2004), a “*gold standard*” nella diagnosi delle PCVDs (Segalés *et al.*, 2005). Quest'aspetto ha permesso di operare utilizzando protocolli diagnostici puntuali ed efficaci (Sarli *et al.*, 2009; Segalés *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda le patologie riproduttive associate a PCV2, la carica virale e le lesioni fetali non sempre elevate ed evidenti (Hansen *et al.*, 2010; Brunborg *et al.*, 2007), addirittura assenti nella scrofa, hanno reso la diagnosi difficoltosa.

Inoltre, a complicare maggiormente un possibile approccio diagnostico è la probabile presenza ambientale di PCV2 che obbliga a porre particolare attenzione alla modalità di prelievo dei campioni ed alla interpretazione di risultati positivi ai test d'indagine biomolecolare.

In tale situazione, quindi, sembra essere la combinazione di più tecniche (IHC o ISH, RT-PCR e ricerca anticorpale nel siero) associata ad una scrupolosa modalità di prelievo dei campioni, a dare informazioni utili al complesso iter diagnostico della patologia riproduttiva associata a PCV2.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'applicazione di un percorso diagnostico per un'azienda o per un veterinario aziendale per avere dati oggettivi al fine di associare il coinvolgimento del PCV2 a problemi riproduttivi denunciati o osservati negli allevamenti suinicoli.

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 Casistica

Presso il servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna sono stati conferiti complessivamente 91 tra suinetti e/o feti abortiti, mummificati, nati morti o disvitali (AMMD), appartenenti a due aziende (A e B) che denunciavano problemi riproduttivi (AMMD, ritorni in estro) e per i quali erano già state indagate altre cause infettive e non infettive responsabili del quadro denunciato.

In particolare la casistica (Tabella 1) è suddivisa come segue:

- 1) l'azienda A, da 15 nidiatae costituite da 213 suinetti, ha raccolto e conferito presso la nostra Sezione 66 AMMD, pari complessivamente al 31,0% del totale partorito con le 15 nidiatae;
- 2) l'azienda B, da 6 nidiatae costituite da 74 suinetti, ha raccolto e conferito presso la nostra Sezione 25 AMMD, pari complessivamente al 33,8% del totale partorito con le 6 nidiatae.

2.2.2 Necropsia e prelievo dei campioni

Tutti gli AMMD sono stati sottoposti a necropsia e relativamente alle condizioni di conservazione e allo stato di disidratazione, soprattutto dei soggetti mummificati, sono stati costantemente campionati: il fegato, la milza, il cuore ed i linfonodi inguinali superficiali (Foto 2.1) dei quali una parte veniva congelata a -20°C ed una parte fissata in formalina tamponata al 10% per poi essere inclusa in paraffina.

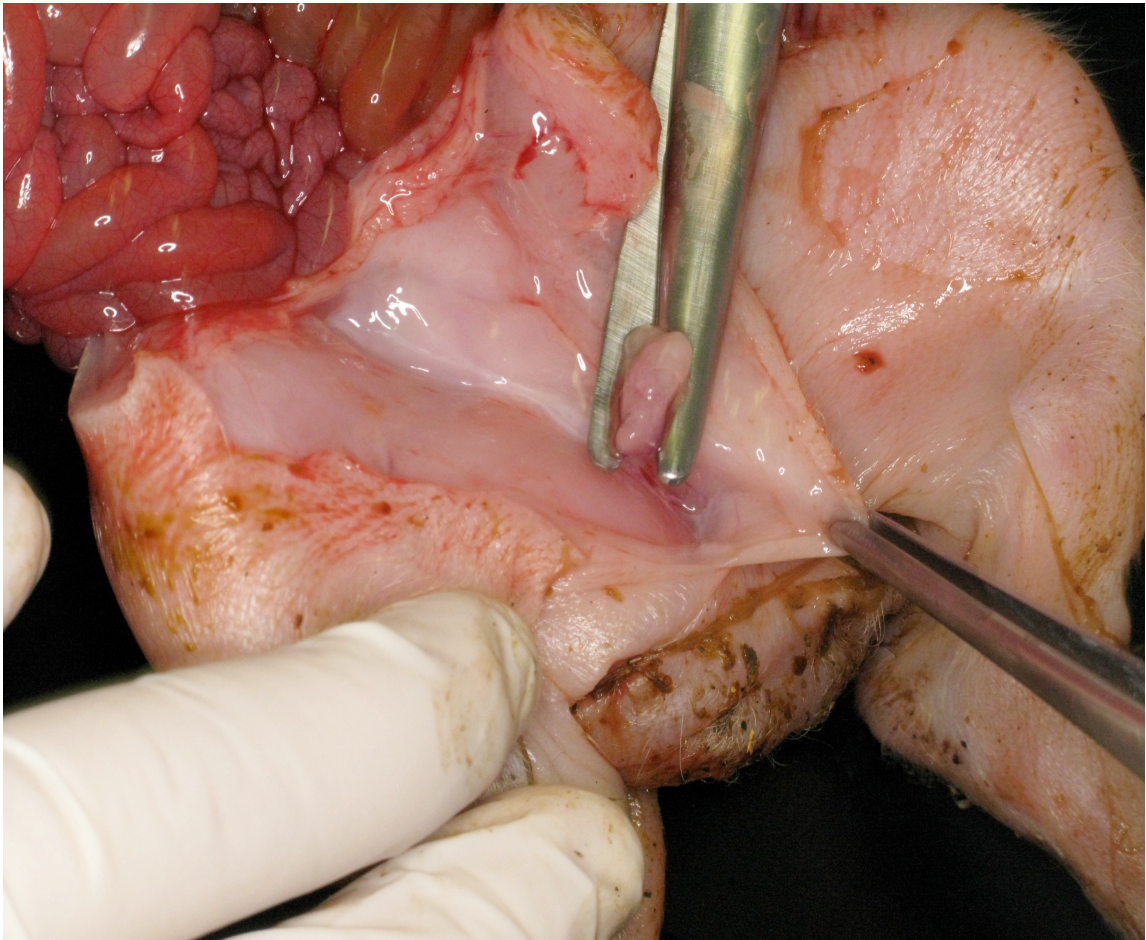


Foto 2.1 - Feto. Prelievo del linfonodo inguinale superficiale.

Inoltre, dai soggetti che presentavano un buono stato di conservazione, aprendo il torace, è stato eseguito, prima di ogni altra manualità, un prelievo di sangue, con siringa sterile, direttamente dalla vena cava caudale (Foto 2.2).

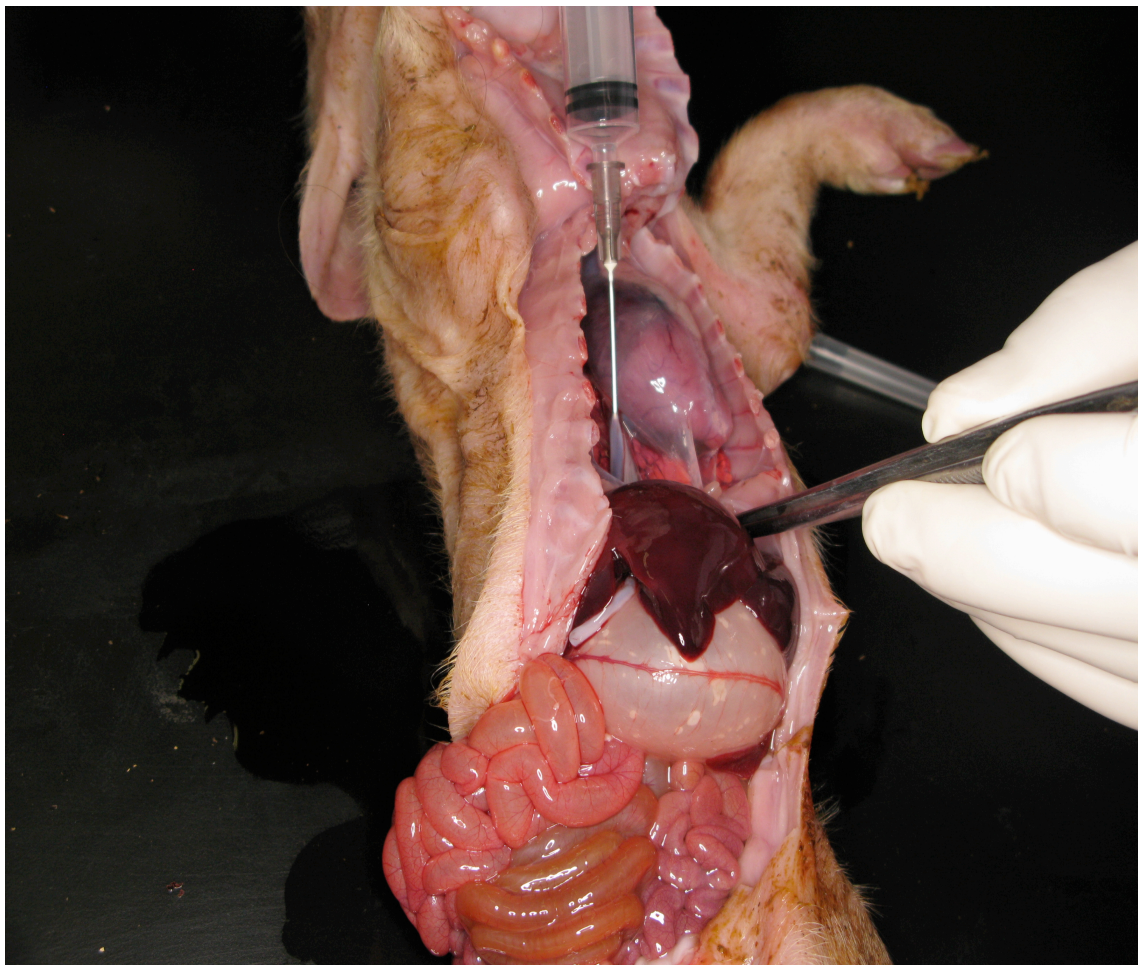


Foto 2.2 - Feto. Prelievo di sangue dalla vena cava caudale.

Ciascun campione di sangue è stato poi trasferito in provette sterili prive di anticoagulante e sottoposte a centrifugazione (1500 xg, per 20 minuti, a temperatura ambiente) allo scopo di ottenere del siero. Tutti i sieri sono stati congelati a -20°C e spediti presso Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) dove sono stati sottoposti a ricerca di anticorpi verso PCV2, PPV (Porcine parvovirus), ADV (Aujeszky's disease virus) e PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) secondo metodiche già standardizzate presso la stessa struttura (vedi punto 2.2.3).

2.2.3 Protocollo diagnostico utilizzato

I campioni sono stati esaminati seguendo lo schema riportato in Figura 2.1.

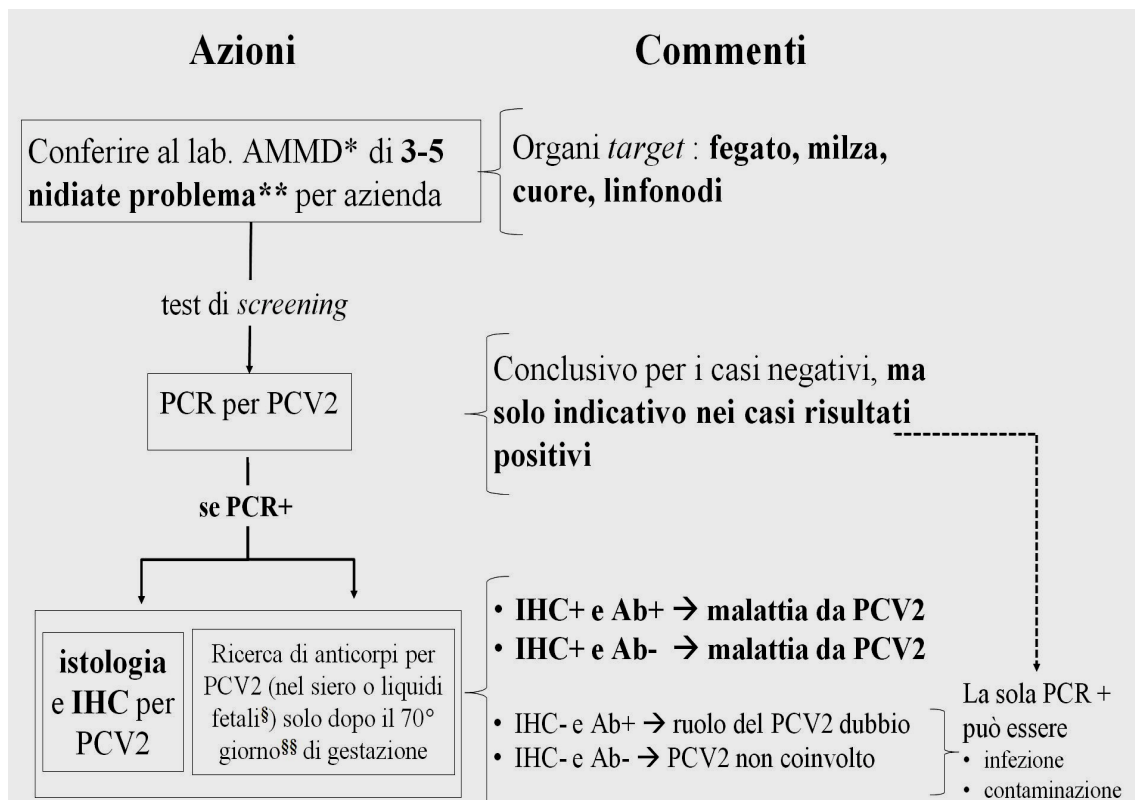


Figura 2.1- Diagramma di flusso del protocollo diagnostico in aziende con problemi riproduttivi in cui si sospetti un ruolo del PCV2. * Aborto/Mummificato/nato-Morto/Disvitale; ** Aborto o nidiata in cui si registrano almeno 4-5 mummificati/nati-morti/disvitali; § Il siero si può ottenere prelevando il sangue dalla vena cava caudale mentre i liquidi fetali sono rappresentati dal materiale siero ematico che spesso si raccoglie nelle cavità in seguito a congelamento/scongelo del feto; §§feto/mummificato ≥ 170 mm di lunghezza (testa-ischio prelevato con calibro rigido) (Straw *et al.*, 2006).

Un pool, ottenuto dagli **organi** prelevati (fegato, milza, cuore e linfonodi inguinali superficiali) da ciascun feto, è stato sottoposto a PCR per PCV2 secondo la metodica descritta da Ouardani *et al.* (1999).

L'estrazione dell'acido nucleico è stata eseguita mediante un "Genomic DNA Extraction Kit" (RBCBioscience), in accordo con le istruzioni del produttore.

L'amplificazione è stata condotta in accordo con il protocollo proposto da Ouardani *et al.* (1999), partendo da una miscela di reazione di 15 µl contenente: 2 µl di DNA estratto, 3 µl di Go Taq Flexi buffer 5x, 2 µl di MgCl₂ 25 mM, 0,38 µl di dNTPs 10 mM, 0,5 µl di ciascun primer (forward S4, reverse AS4) 10 µM, 0,2 µl di Taq Flexi Promega 5U/µl e 6,42 µl di acqua deionizzata nucleasi-free.

L'amplificazione è stata condotta come segue.

- 2 min a 95°C,
- 35 cicli (denaturazione: 95°C per 2 min; appaiamento: 55°C per 1 min e allungamento: 72°C per 1 min),
- 7 min a 72°C.

I prodotti della reazione di amplificazione (frammento atteso: 493 bp) sono stati visualizzati mediante elettroforesi (100 V) su gel di agarosio all'1% in tampone TAE 1x, addizionato di GelRed 1:10.000 (Biotium). Oltre ai campioni, la corsa ha previsto il caricamento di un marker di riferimento (Novagen, 6 µl /pozzetto) che consta di una miscela di frammenti di DNA da 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp.

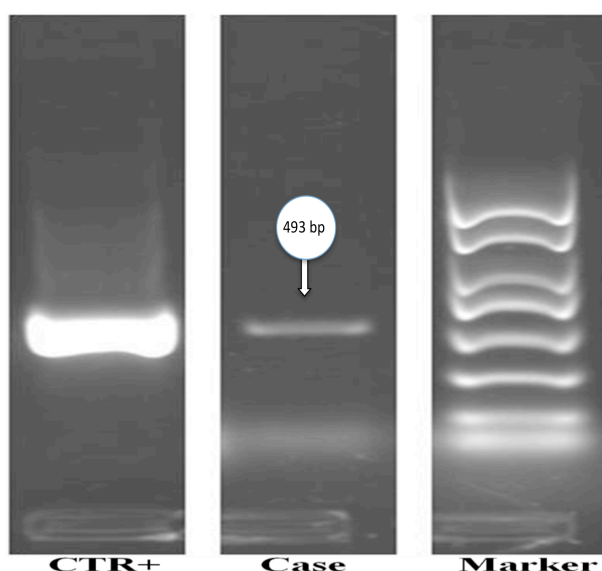


Foto 2.3 - CTR+: DNA isolato da lisato virale di PCV2, ceppo 6503, coltivato nella linea cellulare PK15. Case: esempio di campione positivo per PCV2 in PCR. Marker: mix di frammenti da 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp.

Su ogni singolo pool è stata inoltre eseguita, presso la sezione di Reggio Emilia dell'IZS della Lombardia ed Emilia Romagna, la ricerca del genoma virale per PPV, ADV e PRRSV, secondo quanto descritto rispettivamente da Bonilauri *et al.* (2003), Katz e Pedersen (1992) e Kim *et al.* (2001).

I tessuti risultati PCV2+ alla PCR sono stati, in un secondo momento, sottoposti alle metodiche istologiche di routine: campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina, allestimento di sezioni di circa 4 µm colorate con ematossilina-eosina (E-E) e indagini immunohistochimiche. Per quest'ultime è stato usato un anticorpo monoclonale anti-PCV2 (Mab F217), alla diluizione di 1:200 in tampone fosfato, gentilmente fornito dal Dott. 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 peroxidase, Zymed® Lab, San Francisco, USA) al fine di aumentarne la sensibilità.

Tale metodo ha previsto:

- l'inibizione delle perossidasi endogene: 0,3% di H₂O₂ in metanolo per 30 min a temperatura ambiente (TA),
- lo smascheramento dei siti antigenici: 0,05% di Protease XIV pH 7,5 per 15 min a 37°C,
- l'incubazione con anticorpo primario diluito 1:200 in tampone fosfato (PBS) per una notte a 5°C,
- il sistema di rilevazione streptavidina-biotina-perossidasi polimerico: Kit Dako (code K0690): Biotinylated link per 15 min più Streptavidin-HRP per 15 min a TA,
- la colorazione con una soluzione di cromogeno (DAB, diaminobenzidina alla concentrazione di 0,02% e H₂O₂ 0,001% in PBS) per 10 min a TA,
- la colorazione di contrasto con Ematossilina di Papanicolau diluita 1:2 per 3 sec.

Sui **sieri**, invece, è stata condotta sia la ricerca di anticorpi anti-PCV2 usando il kit SERELISA® PCV2 Ab della Synbiotic (Lyon, France) secondo la metodica di Perreul *et al.*

(2010) sia la ricerca di anticorpi nei confronti di PPV, ADV e PRRSV utilizzando test ELISA di tipo competitivo (rispettivamente secondo Brocchi *et al.*, 1990, Cordioli *et al.*, 1996, Sala *et al.*, 2000).

Tali indagini sono state eseguite presso l'IZSLER di Brescia.

La nidiata è stata considerata “*positiva*” quando almeno uno dei soggetti esaminati (proveniente dalla stessa nidiata) è risultato positivo alla ricerca del genoma virale (PCR+); invece denominata “*nidiata problema*” quando caratterizzata da aborto o dalla presenza, sul totale dei nati, di almeno 4-5 soggetti mummificati/nati-morti o disvitali.

Tuttavia, il PCV2 è stato considerato responsabile dell'episodio di patologia riproduttiva associato ad AMMD quando i campioni esaminati sono risultati positivi alla ricerca del genoma virale e contestualmente è stata messa in evidenza una positività all'IHC e/o alla ricerca di anticorpi anti-PCV2 nel siero dei prodotti del concepimento (Figura 1). Quest'ultima è un'evenienza che può verificarsi in suinetti oltre il 57° giorno di gravidanza, oltre il quale essi divengono immunocompetenti e la presenza degli anticorpi è da intendersi come una risposta attiva del suinetto, quindi non imputabile a trasferimento passivo con la placenta che nel suino non consente il passaggio di anticorpi.

2.3 RISULTATI

Nell'azienda A sono risultati PCR+, complessivamente, 14 dei 66 suinetti esaminati (21,2%); in 7 delle 15 nidiatae (46,7%) è stato rilevato almeno un soggetto PCR+ (Tabella 2.1).

Nell'azienda B sono risultati PCR+ 11 su 25 suinetti (44,0%) e 4 nidiatae su 6 (66,7%) (Tabella 1). Nelle nidiatae positive provenienti dall'azienda A, il 35,2% dei suinetti era nato morto, disvitale o mummificato; tale percentuale si riduceva al 23,4% nelle nidiatae PCR-.

Nelle nidiatae positive provenienti dall'azienda B, il 32,1% dei suinetti era nato morto, disvitale o mummificato mentre tale percentuale era del 22,2% nelle nidiatae PCR-.

Azienda	Numero di suinetti AMMD* positivi a PCV2 in PCR	Nidiatae esaminate	Nidiatae PCR positive**	Suinetti AMMD/ nidiatae PCR+	Suinetti AMMD/ nidiatae PCR-
A	14 (21,2%)	15	7 (46,7%)	35,2%	23,4%
B	11 (44,0%)	6	4 (66,7%)	32,1%	22,2%

Tabella 2.1 - Risultati della PCR per PCV2. *Aborto/Mummificato/nato-Morto/Disvitale; **una nidiata è considerata PCR+ se almeno un AMMD risulta PCR+.

La tabella 2.2 riporta i risultati ottenuti dalle valutazioni condotte considerando esclusivamente le nidiatae che potevano rientrare nella definizione di “nidiata problema”: 5 (pari al 50% del totale) per l'azienda A e 4 (pari al 80% del totale) per l'azienda B. Secondo questo criterio interpretativo, la percentuale di soggetti AMMD in nidiatae PCR+ passava dal 35,2% al 44,2% contro il 30,1% evidenziato nelle nidiatae PCR- dell'azienda A.

Azienda	Numero di suinetti AMMD* positivi a PCV2 in PCR	Nidiatae “problema”	Nidiatae “problema” PCR+**	Suinetti AMMD/ nidiatae PCR+	Suinetti AMMD/ nidiatae PCR-
A	10 (18,18%)	10	5 (50%)	44,2%	30,1%
B	11 (47,82%)	5	4 (80%)	32,1%	0***

Tabella 2.2 - Risultati della PCR per PCV2 considerando solo le “nidiatae problema” (aborto o nidiata con più di 4-5 MMD). *Aborto/Mummificato/nato-Morto/Disvitale; **una nidiata è considerata PCR+ se almeno un AMMD risulta PCR+; * Mancano le nidiatae problema risultate PCR-.**

Le osservazioni necroscopiche e istologiche non hanno mostrato lesioni riconducibili all'infezione da PCV2, mentre l'immunoistochimica (Figura 2.2) ha evidenziato positività, seppur debole, intracitoplasmatica negli epatociti, focale nei miocardiociti e in rare cellule dendritiche del linfonodo inguinale superficiale di 2 suinetti appartenenti ad una stessa nidiata dell'azienda A.

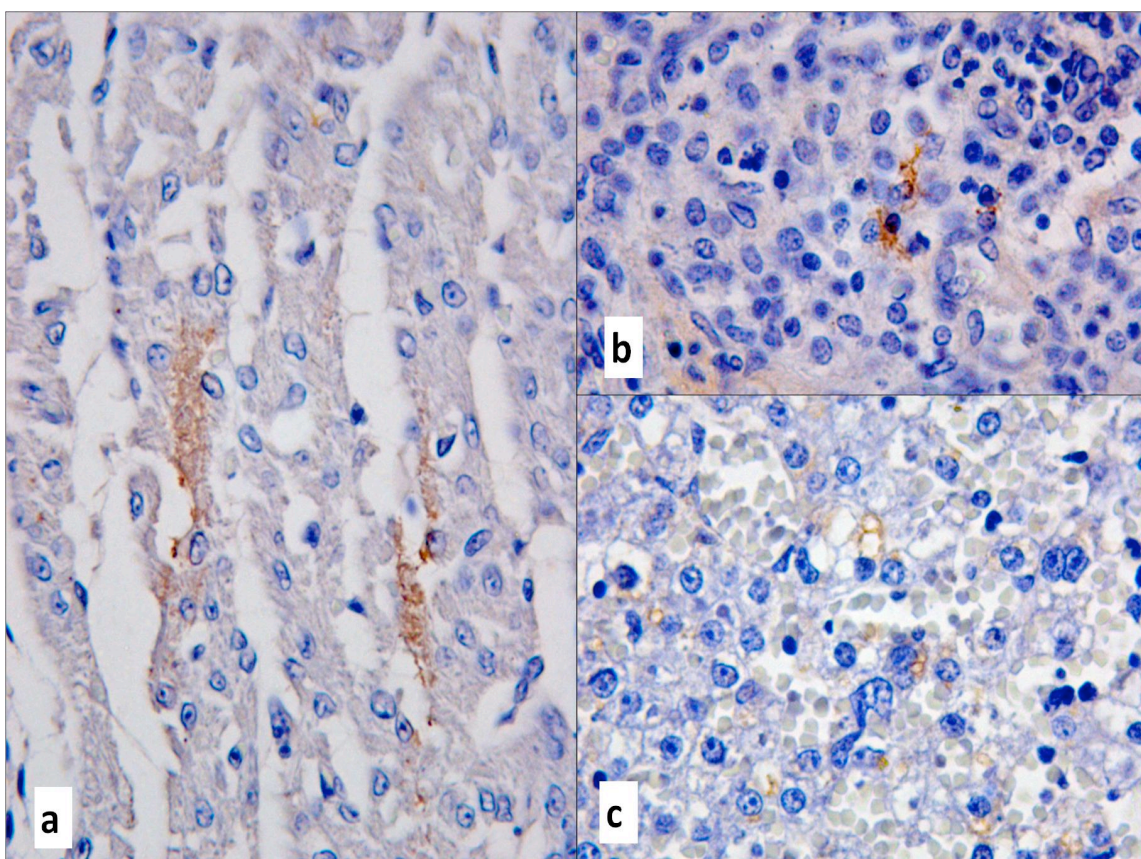


Figura 2.2 - Suino. Soggetto nato morto: a) cuore, debole e multifocale reazione immunoistochimica positiva per PCV2 nel sarcoplasma di alcuni miocardiociti, 400x; b) linfonodo inguinale superficiale, moderata e focale reazione immunoistochimica positiva per PCV2 nel citoplasma di alcune cellule dendritiche, 400x; c) fegato, debole e multifocale reazione immunoistochimica positiva per PCV2 nel citoplasma di alcuni epatociti, 400x. (da Morandi *et al.*, 2011).

Solo 2 sieri sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-PCV2 e, in entrambi i casi, provenivano da soggetti PCR-, appartenenti a due differenti “nidiata problema” (un aborto PCR- ed una nidiata PCR+ con 11 nati morti su 18) dell'azienda A.

In nessun soggetto esaminato sono stati evidenziati il genoma di ADV, PRRSV, PPV o i relativi anticorpi specifici.

2.4 DISCUSSIONE

Secondo Segalés *et al.* (2006), la diagnosi di patologia riproduttiva associata all'infezione da PCV2 può essere emessa quando sono contemporaneamente presenti i seguenti aspetti:

- a) aumento del numero di AMMD,
- b) lesioni miocardiche fibrotiche e/o necrotizzanti,
- c) riscontro di PCV2 nel contesto delle lesioni.

Tuttavia, alla luce di quanto riportato successivamente da Hansen *et al.* (2010) e Brunborg *et al.* (2007) questi tre criteri non sembrano sempre sufficienti a definire, escludendolo o dimostrandolo, il ruolo del PCV2 in episodi di patologia riproduttiva.

E' noto, infatti, che la carica virale dimostrabile in corso di PCVD o PMWS (Brunborg *et al.*, 2004) è sensibilmente più elevata di quanto non sia dimostrabile nel caso di patologie riproduttive associate all'infezione da PCV2 (Hansen *et al.*, 2010; Brunborg *et al.*, 2007). Ne consegue quindi che i criteri interpretativi impiegati per le PCVD e relativi alla quantità di virus presente nel contesto delle lesioni (10^7 copie di DNA virale per 500 ng di acido nucleico estratto – Hansen *et al.*, 2010; Brunborg *et al.*, 2007) non possono essere estesi anche nei casi di patologia riproduttiva associata a PCV2.

Altro aspetto critico da prendere in considerazione è rappresentato dalla diversa sensibilità delle tecniche di quantificazione della presenza del virus nei tessuti (IHC e RT-PCR) attualmente utilizzate. In considerazione del fatto che la soglia di sensibilità dell'IHC è relativamente alta, necessitando di almeno 10^7 copie di DNA virale per 500 ng di acido nucleico estratto, è evidente come le metodiche in situ possano frequentemente fornire esiti falsamente negativi. A tal proposito gli stessi Autori (Hansen *et al.*, 2010) suggeriscono che il riscontro in una nidata

di 1 feto con $> 10^7$ copie DNA virale per 500 ng di acido nucleico estratto o di 2 feti con 10^4 - 10^7 copie DNA virale per 500 ng di acido nucleico estratto sia sufficiente per formulare, utilizzando una tecnica RT-PCR, la diagnosi di episodio di patologia riproduttiva sostenuta da PCV2.

In una sola delle due aziende prese in esame nel corso del presente lavoro (azienda A), il protocollo impiegato, seppur con il conferimento di AMMD da 10 “nidiate problema”, ha messo in evidenza delle reazioni positive alla tecnica in situ utilizzata (IHC) portando ad ipotizzare che PCV2 possa aver avuto un ruolo nel determinismo dei problemi riproduttivi osservati nell'allevamento.

Nell'azienda B, di cui sono stati conferiti AMMD da 5 “nidiate problema”, l'intero iter diagnostico si è concluso solo con l'ipotesi di una probabile infezione da PCV2.

Altro aspetto sicuramente meritevole di approfondimenti, ma di per sé interessante anche se non statisticamente significativo, è che i risultati mostrano in entrambe le aziende una percentuale di AMMD più alta in nidiate PCR+ rispetto alle PCR-, differenza che tende ad aumentare valutando in modo più restrittivo i risultati stessi. Questi aspetti assumono maggiore importanza qualora, come nel caso dell'azienda A, 2 suinetti presentano anticorpi anti-PCV2 e nessuna evidenza, diretta o indiretta, d'infezione sostenuta da PPV, PRRSV e ADV.

2.5 CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati presentati seppur preliminari e delle considerazioni esposte, l'impiego di tecniche in situ quali IHC per la diagnosi di patologia riproduttiva associata a PCV2 non sembrano da sole garantire un sufficiente livello di sensibilità.

A tal proposito si può concludere che, per la corretta valutazione di un possibile coinvolgimento del PCV2 in episodi di patologia riproduttiva, è indispensabile:

- 1) inviare al laboratorio tutti i soggetti AMMD, provenienti da nidiate con più di 4-5 AMMD e, possibilmente, inviare non meno di 6-7 nidiate per azienda,
- 2) prestare particolare attenzione alle modalità di prelievo dei campioni da esaminare allo scopo di evitare contaminazioni,
- 3) quando possibile, prelevare il sangue per la ricerca di anticorpi specifici per PCV2 e altri agenti abortigeni dalla vena cava caudale o, come descritto da Perreul *et al.* (2010), prelevando liquidi fetali intracavitari.

Produzione scientifica personale

- Morandi F., Panarese S., Maserati A., Granito G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Lelli D., Leotti G., Bianchi M., Brunetti B., **Ferrara D.**, Vila T., Joisel F., Ostanello F., Sarli G.: "Preliminary results of a diagnostic protocol for the assessment of PCV2 involvement in swine reproductive failure". Proceeding of the 5th International Asian Pig Veterinary Society Congress, 47, 2011.
- Morandi F., Panarese S., Maserati A., Granito G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Lelli D., Leotti G., Bianchi M., Brunetti B., **Ferrara D.**, Bianco C., Vila T., Joisel F., Ostanello F., Sarli G.: "Risultati preliminari sull'impiego di un protocollo diagnostico per la valutazione del coinvolgimento del PCV2 nella patologia riproduttiva del suino". Atti SIPAS, XXXVII, 218-225, 2011.

Bibliografia

- - Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Merialdi 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., Schonheit 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: 368–375.
- - Brunborg I.M., Moldal T., Jonassen C.M. (2004) “Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR.” J Virol Methods. 122:171-178.
- - Chae C. (2005) “A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases”. Vet J. 169: 326-336.
- - Cordioli P., Sala G., Brocchi E., Gamba D., De Simone F., (1996) “Diagnostic use of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus”. Proc. 14th International Pig Veterinary Society Congress. pp. 86.

- - Corradi A., Dottori M., Gaiadella L., Rosignoli C., Cantoni A.M., Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., Faccini S., Costa A., Leotti G., Cabassi E. (2004) "Infezione da porcine circo virus tipo 2 (PCV2) e aborto". Atti XXX Meeting Annuale SIPAS. pp. 215-221.
- - Hansen M.S., Hjulsager C.K., Bille-Hansen V., Haugegaard S., Dupont K., Høgedal P., Kunstmann L., Larsen L.E. (2010) "Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures". *Vet Microbiol.* 144: 203-209.
- - Katz J.B., Pedersen 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 polymorphisms". *Biologicals.* 20:187-195.
- - 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: 304-305.
- - 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.
- - 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.
- - Ouardani M., Wilson L., Jetté R., Montpetit C., Dea S., (1999) "Multiplex PCR for detection and typing of Porcine Circoviruses." *J. Clin. Microbiol.* 37 (12): 3917-53924.
- - Perreul G., Fily B., Longo S., Vila T., Herin J.B., Venet J., Joisel F. (2010) "Porcine circovirus type 2 (PCV2) prevalence in abortions in France". Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada July 18-21, pp. 1111.
- - 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". In: Proc. 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology. pp. 253–254.
- - 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.
 - - Segalés J., Allan G.M., Domingo M. (2006) "Porcine circovirus diseases". In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. (Eds.). *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Oxford. pp. 299–307.
 - - Segalés J., Allan G.M., Domingo M. (2005) "Porcine circovirus diseases". *Anim Health Res Rev.* 6: 119-142.
 - - Straw B.E., Dewey C.E., Wilson M.R. (2006) "Differential Diagnosis of Swine Diseases". In: *Diseases of Swine*, ed. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, and Taylor DJ, 9th ed., Chapter 3. pp. 41-85. Ames, IA.
 - - West K.H., Bystrom J.M., Wojnarowicz C., Shantz N., Jacobson M., Allan G.M., Haines D.M., Clark E.G., Krakowka S., McNeilly 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.

3 SCROFE CONVENZIONALI FECONDATE CON SEME ARTIFICIALMENTE INFETTATO CON PCV2

3.1 INTRODUZIONE

Negli ultimi anni alcune patologie riproduttive sono state messe in relazione al PCV2. Infatti, le prime segnalazioni di campo in Canada (West *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2001) e in Danimarca (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001) ed il primo studio organico sull'argomento nel Nord Italia nel 2004 (Corradi *et al.*, 2004) hanno previsto l'isolamento di PCV2 da prodotti di aborto/natimortalità. Da allora molta attenzione è stata rivolta, sia attraverso indagini epidemiologiche mirate sia mediante infezioni sperimentali, a definire il possibile ruolo rivestito da questo virus nella patologia riproduttiva del suino. 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. Inoltre, tanto più a lungo questa si protrae, maggiore è la probabilità che tale evento si realizzi (Sanchez *et al.*, 2003).

Tuttavia è stato dimostrato, mediante prove d'infezione sperimentale, che non sempre l'inoculazione per vie diverse da quella genitale (ad esempio, diretta in utero o infettando gli embrioni) è in grado di causare l'infezione dei feti (Gillespie, 2007). In tali condizioni, seppure la viremia si realizzi, la patologia riproduttiva riscontrata è prevalentemente rappresentata da aborto e, in assenza di un riscontro di positività virologica nei feti, è imputata allo stato di malessere generale (febbre, anoressia, ecc.) conseguente all'infezione e non a un'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 se veicolato dal seme o da ovuli infetti (Cariolet *et al.*, 2001; Bielansky *et al.*, 2004; Mateusen, 2007), o come conseguenza dell'infezione diretta delle vie genitali (Bielansky *et al.*, 2004). Nello studio effettuato da Madson *et al.*, (2009) è stata riprodotta l'infezione mediante inseminazione con seme infetto, con conseguenti disturbi della sfera riproduttiva e ottenimento di un'infezione fetale. Oltre che mediante trasmissione verticale con i gameti, il virus può raggiungere i prodotti del concepimento attraversando la placenta, sia con meccanismo diretto (cioè con particelle virali libere nell'interstizio), sia veicolato da cellule, in particolare macrofagi, capaci di mascherare il virus ai meccanismi di controllo immunitario anche in animali sieropositivi (Pensaert *et al.*, 2004). In utero non è stata dimostrata la contemporanea infezione di tutti i feti: in genere tale evenienza occorre in pochi soggetti e, anche se risulta essere capace di propagarsi agli altri, procede lentamente in modo che solo pochi prodotti del concepimento sviluppano l'infezione e possono risultare positivi alle indagini diagnostiche (Sanchez *et al.*, 2003).

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 anche se costituisce un'eventualità estremamente frequente non necessariamente è la causa delle manifestazioni patologiche evidenziabili in allevamento. Il corretto protocollo diagnostico delle "PCV2 related diseases", citato nel capitolo precedente, 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).

La diagnosi d'infezione fetale da PCV2 è stata eseguita:

- o mediante PCR abbinata all'esame istologico (non sempre corredato anche con indagine immunoistochimica) sugli organi bersaglio (Bodgan *et al.*, 2001, Madson *et al.*, 2009),
- o con PCR abbinata alla sierologia (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001),
- o con esame istologico ed immunoistochimico sugli organi bersaglio (O'Connor *et al.*, 2001; Mateusen, 2007).

Anche se esistono evidenze di una sensibilità degli embrioni e dei feti di suino al PCV2 in qualsiasi fase della gravidanza (Sanchez *et al.*, 2003), 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 in tali casi è possibile mettere in evidenza il virus nei tessuti fetali anche in assenza di reattività sierologica specifica per PCV2. Viceversa, infezioni fetali che si realizzino dopo l'acquisizione della 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). Johnson (2002) ha dimostrato come il PCV2 può 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.

Nello studio condotto da Madson *et al.* (2009) è stata riprodotta un'infezione sperimentale mediante inseminazione artificiale con seme infetto. La gravidanza è stata portata a termine con fenomeni di nascita prematura e feti mummificati. Le dimensioni dei feti mummificati indicavano che la morte fetale era avvenuta tra il 42° e 105° giorno di gravidanza.

E' noto che lesioni si rilevano in maggior misura in feti che si infettano prima del 57° giorno di gestazione e quindi prima dello sviluppo dell'immunocompetenza. Inoltre è stato dimostrato, da

indagini sperimentali, che le blastocisti sono resistenti all'infezione fintanto che sono protette dalla zona pellucida (Gillespie, 2007). Tuttavia, è stato dimostrato, attraverso indagini sperimentali, che oociti e spermatozoi PCV2 positivi possono produrre una blastocisti infetta (Galeati *et al.*, 2011).

Studi epidemiologici hanno però 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). 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 concernenti il ruolo svolto dal PCV2 nella patogenesi di fenomeni di natimortalità/aborto, mentre sono più scarse le conoscenze riguardanti il possibile ruolo che questo virus svolge 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 già stato riportato nella Figura 1 del capitolo precedente. La possibile infezione di solo una parte dei feti rende necessario applicare il protocollo diagnostico a un gruppo di soggetti piuttosto che a un unico feto. Sia da indagini sperimentali (Harms, 1999; West *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2001) sia da attività diagnostica condotta routinariamente su prodotti di natimortalità/aborto del suino (Ladekjær-Mikkelsen *et al.*, 2001) emerge che l'azione patogena di PCV2 è 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 immunoistochimico) 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.

Numerosi lavori sperimentali hanno 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).

Scopo del presente studio è stato quello di valutare:

- la possibilità di infettare scrofe convenzionali mediante l'utilizzo di seme sperimentalmente esposto a PCV2,
- il ruolo di PCV2 nella fase iniziale e intermedia di gravidanza.

Il protocollo sperimentale impiegato riproduce quanto potrebbe accadere in allevamento: un recente studio condotto in Austria e Germania ha, infatti, dimostrato una significativa prevalenza di PCV2 (18,2%) nel seme (Schmoll *et al.*, 2008).

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 Benessere animale

Il protocollo sperimentale per questo studio ha ricevuto la verifica e l'approvazione da parte del Comitato Etico e Scientifico dell'Università di Bologna.

Gli animali sono stati utilizzati in accordo con la Direttiva 86/609/CEE recepita dal D.Lgs. n° 116 del 27 Gennaio 1992 riguardante la protezione degli animali usati per fini sperimentali o altri scopi scientifici.

Il numero minimo di animali è stato utilizzato nel rispetto della normativa vigente, della “legge delle 3R” e della integrità scientifica dell'elaborato.

Gli animali sono stati manipolati esclusivamente da medici veterinari o da personale accuratamente addestrato.

3.2.2 Animali e stabulazione

Nove scrofette, di circa 6 mesi d'età, clinicamente sane e di razza Large White, sono state acquistate presso un allevamento commerciale convenzionale.

Al momento dell'arrivo un medico veterinario ha preso visione del Modello 4 (dichiarazione di provenienza e di destinazione degli animali) e visitato i singoli animali facendo particolare attenzione alla presenza di problemi comportamentali e di eventuali segni di diarrea o di patologie respiratorie.

Le nove scrofe sono state arruolate nello studio, etichettate individualmente attraverso una marca auricolare e pesate (peso medio di circa 95 kg di p.v.).

Gli animali sono stati divisi, secondo un criterio randomizzato, in 2 gruppi: gruppo di controllo (anche detto gruppo “C”, formato da 3 animali: C28, C30 e C31) e gruppo di infetti (gruppo “I”, costituito da 6 soggetti: I25, I26, I27, I29, I32, I33).

Ciascun gruppo è stato poi posto in un locale diverso per evitare problemi di contaminazione crociata.

Gli animali sono stati tenuti in uno stabulario con accesso limitato al solo personale autorizzato e sono state osservate rigorose norme di biosicurezza: ogni contatto con i soggetti sani e infetti è avvenuto previo utilizzo di dispositivi di protezione individuali monouso da parte degli operatori.

I due locali hanno presentato omogeneità di microclima: temperatura e umidità sono state controllate costantemente per ridurre al minimo un possibile stress termico ed è stato rispettato un fotoperiodo artificiale con 10 ore di luce (8:00-18:00) e 14 di buio (18:00-8:00). Ciascun animale, durante tutto lo studio sperimentale, è stato stabulato in un box singolo (2,7 x 2,7 m) per fornire allo stesso un'adeguata superficie di esteriorizzazione delle proprie caratteristiche comportamentali e di produzione (Foto 3.1).

Ogni box è stato dotato di una mangiatoia a terra e di un abbeveratoio a succhiotto collegato alla rete idrica municipale. Il singolo soggetto è stato alimentato due volte al giorno con una razione di mangime da finissaggio.



Foto 3.1- Stabulazione degli animali.

Contestualmente alla somministrazione di alimento si è provveduto al rilievo della temperatura rettale e alla osservazione/registrazione della presenza di eventuali segni clinici e/o di ritorno in calore.

3.2.3 Preparazione del PCV2 utilizzato per l'inseminazione

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 anti-PCV2.

3.2.4 Preparazione del materiale seminale utilizzato per l'inseminazione

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

Esso è stato esaminato per valutarne le caratteristiche di concentrazione, motilità e compatibilità con il medium diluitore del virus. Inoltre il seme è stato saggiato attraverso una Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) onde escludere la presenza di DNA del PCV2.

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 (gruppo I) e tre dosi con 10 ml di medium privo di virus (gruppo C). Le dosi sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente prima della inseminazione artificiale (IA).

3.2.5 Protocollo sperimentale

Dopo un periodo di acclimatazione di 5 giorni si è proceduto alla sincronizzazione-superovulazione dell'estro nelle scrofette mediante:

- somministrazione per via intramuscolare di eCG alla dose di 1500 UI/scrofa (Folligon®-Intervet),
- dopo 60 ore da questa, somministrazione per via intramuscolare di hCG alla dose di 750 UI/scrofa (Corulon®-Intervet).

Quaranta ore più tardi gli animali sono stati inseminati, utilizzando un catetere tipo Melrose sterile (Foto 3.2), con una singola dose: le 6 scrofe del gruppo I hanno ricevuto seme infettato

sperimentalmente mentre i 3 animali del gruppo C hanno ricevuto il seme addizionato del solo medium.

A distanza di 21-22 giorni dall'inseminazione i soggetti sono stati controllati accuratamente per rilevare eventuali ritorni in calore.



Foto 3.2 - Inseminazione artificiale con catetere tipo Melrose sterile.

Al 29° giorno di gestazione, onde confermare la gravidanza, tutti gli animali sono stati sottoposti ad esame ecografico: le scrofe non gravide (C30, I27, I32, I33) sono state sacrificate mentre quelle risultate gravide sono state sacrificate al 52° (C31), 55° (I25 e I26) e 56° (C28 e I29) DPI.

Il protocollo farmacologico utilizzato per l'eutanasia è stato il seguente:

- premedicazione: somministrazione IM di Azaperone (Stresnil® - Janssen Animal Health, Beerse, Belgium) seguita dopo 20 minuti da Ketamina (Ketavet100® - Intervet Productions S.r.l., Milan, Italy)
- induzione, dopo 20 minuti, con Tiopentale sodico 50 mg/ml per via EV (Pentothal Sodium Intervet Productions S.r.l., Milan, Italy)
- immediatamente dopo, somministrazione EV di Tanax (Tanax® - Intervet Italia, Latina, Italy).

3.2.6 Campionamento *in vivo*

Due giorni prima della fecondazione (giorno -2), da ciascuna scrofa sono stati eseguiti:

- tamponi vaginali, nasali e rettali,
- prelievi ematici (Foto 3.3).



Foto 3.3 - Prelievo ematico dalla vena giugulare.

Successivamente gli stessi campionamenti sono stati eseguiti con cadenza settimanale fino al 56° giorno post-inseminazione (DPI). Al fine di non interferire con il riconoscimento materno di gravidanza (13°÷18° DPI), le scrofette non sono state sottoposte a prelievo ematico il 14° DPI (Hafez *et al.*, 2000). Lo schema del campionamento è riportato in Tabella 3.1.

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

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 del sacrificio della singola scrofa è stata condotta anche la ricerca di anticorpi anti PPV, ADV e PRRSV.

Al fine di monitorare lo stato riproduttivo (estrale o di gravidanza), in tutte le scrofe è stata valutata la concentrazione del progesterone ematico (P4) nell'arco di tempo compreso tra l'inizio della sperimentazione ed il 28° DPI, ad eccezione delle scrofe non gravide, testate fino al giorno del sacrificio.

Campioni e test di laboratorio	Giorni di campionamento											
	Giorni pre-inseminazione	Giorni post-inseminazione										
	-2	7	14	21	28	35	42	49	52*	55*	56*	
PCR tamponi (vaginale, rettale, nasale)	PCV2 PRRSV PPV ADV	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2
PCR siero (sangue)	PCV2 PRRSV PPV ADV	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 eccetto C30, I32	tutte eccetto C30, I32,	I25, I26, C28, I29, C31	C31	I25, I26	C28, I29	

Tabella 3.1 - Schema temporale dei campionamenti e tipo di test eseguito. * prelievi realizzati prima dell'eutanasia nella scrofa identificata nell'ultima riga in basso; ** al giorno -2 DPI e al giorno dell'eutanasia è stata eseguita la titolazione anticorpale anche per PRRSV, PPV e ADV.

3.2.7 Campionamento *post-mortem*

Ogni scrofa è stata sottoposta a un accurato e approfondito esame necroscopico volto a evidenziare la presenza di lesioni macroscopiche.

Da ciascuna scrofa sono stati prelevati campioni dei seguenti organi: tonsille, milza, linfonodi (inguinali superficiali, uterini e tracheo-bronchiali), cuore, polmone, fegato, rene, ileo, ovaie, salpingi, utero e vagina.

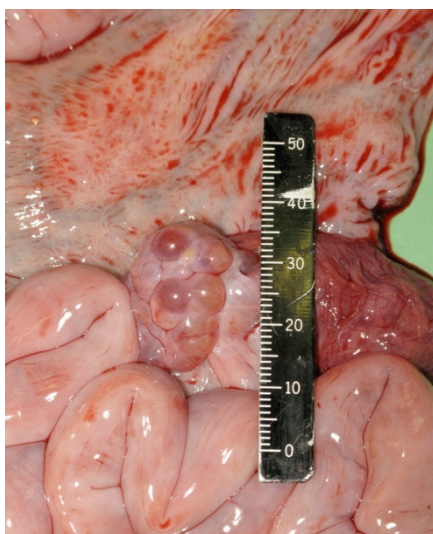


Foto 3.4 - a: ovaia sinistra (scrofa I27);

3.4 - b: ovaia destra (scrofa I27).

(animale in fase pro estrale, assenza di corpi lutei).

Gli apparati riproduttori dei soggetti gravidi sono stati esaminati (Foto 3.4a e 3.4b) e si è provveduto all'isolamento e al prelievo di tratti di placenta in corrispondenza del singolo feto con prelievo sterile del liquido amniotico.

I feti invece sono stati inizialmente esposti e conseguentemente numerati a partire dall'apice del corno sinistro (Foto 3.5).



Foto 3.5 - Esposizione e numerazione dei feti.

Da ciascuno di questi feti sono stati inoltre prelevati campioni di fegato, milza e cuore.

Aliquote speculari di ciascun campione sono state utilizzate per:

- ricerca del genoma virale mediante RT-PCR e PCR qualitativa;
- indagine istopatologica ed immunohistochimica per PCV2.

3.2.8 Dosaggio progesterone

La valutazione del P4 è avvenuta attraverso dosaggi radioimmunologici:

- aliquote di siero da 200 μ l sono state estratte con 5 ml di etere di petrolio,
- l'etere è stato separato e fatto evaporare sotto un getto di N₂,
- gli estratti ottenuti sono quindi stati risospesi in 1 ml di tampone fosfato testandone aliquote da 100 μ l.

La sensibilità del saggio è stato pari a 1,0 pg/aliquota ed i risultati ottenuti sono stati espressi in ng/ml (Tamanini *et al.*, 1985).

Tale indagine è stata eseguita presso la sezione di fisiologia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

3.2.9 Metodica PCR

L'estrazione dell'acido nucleico di PCV2 dai diversi campioni (siero, tamponi e organi) è stata eseguita mediante Trizol LS (Invitrogen), in accordo con le istruzioni del produttore.

L'amplificazione è stata condotta in accordo con il protocollo proposto da Olvera *et al.* (2004).

I campioni sono anche stati controllati ad inizio e fine esperimento per PRRSV, PPV, ADV (virus potenzialmente responsabili di turbe riproduttive) secondo protocolli descritti rispettivamente da Bonilauri *et al.* (2003), Katz e Pedersen (1992) e Kim *et al.* (2001).

Tali indagini sono state eseguite presso l'IZSLER di Reggio Emilia.

3.2.10 Indagini sierologiche

La ricerca di anticorpi nei confronti di PCV2, PPV, PRRSV e ADV è stata effettuata utilizzando metodiche ELISA competitive standardizzate presso l'IZSLER di Brescia secondo Brocchi *et al.* (1990), Cordioli *et al.* (1996), Sala *et al.* (2000).

3.2.11 Istologia ed immunoistochimica

I campioni istologici sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, processati e inclusi in paraffina. Sezioni di circa 4 μm sono state colorate con ematossilina ed eosina (EE).

Sui tessuti fissati è stata anche realizzata una colorazione immunoistochimica con l'ausilio di anticorpi anti-PCV2 (Mab F217), alla diluizione di 1:200 in tampone fosfato, forniti dal Dott. G. Allan (Veterinary Sciences Division, Department of Agriculture and Rural Development, 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, San Francisco, USA) al fine di aumentarne la sensibilità.

Tale metodo ha previsto:

- l'inibizione delle perossidasi endogene: 0,3% di H_2O_2 in metanolo per 30 min a temperatura ambiente (TA),
- lo smascheramento dei siti antigenici: 0,05% di Protease XIV pH 7,5 per 15 min a 37°C,
- l'incubazione con anticorpo primario diluito 1:200 in tampone fosfato (PBS) per una notte a 5°C,
- il sistema di rilevazione streptavidina-biotina-perossidasi polimerico: Kit Dako (code K0690): Biotinylated link per 15 min più Streptavidin-HRP per 15 min a TA,
- la colorazione con una soluzione di cromogeno (DAB 0,02% e H_2O_2 0,001% in PBS) per 10 min a TA,
- la colorazione di contrasto con Ematossilina di Papanicolau diluita 1:2 per 3 sec.

3.3 RISULTATI

3.3.1 Sincronizzazione e diagnosi di gravidanza

A quaranta ore dalla somministrazione di hCG, in tutte le scrofe sono stati riscontrati segni di estro, eccezion fatta per il soggetto C31, già in estro al momento della sincronizzazione.

Segni visibili di ritorno in estro 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-inseminazione solo in questo animale.

Al 23° DPI, 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, neanche, presentato un aumento del progesterone ematico fino al 28° DPI.

Come riportato nel Grafico 1, nei soggetti I27 e I32 non sono state osservate variazioni nel titolo del P4 fino al 42° DPI e 28° DPI, rispettivamente (quindi non è stato possibile dimostrare l'estro nei giorni precedenti). I valori di P4 sono andati invece aumentando nel soggetto I33 dopo il 35° DPI seppure non siano stati preceduti da segni clinici evidenti di estro (Grafico 3.1).

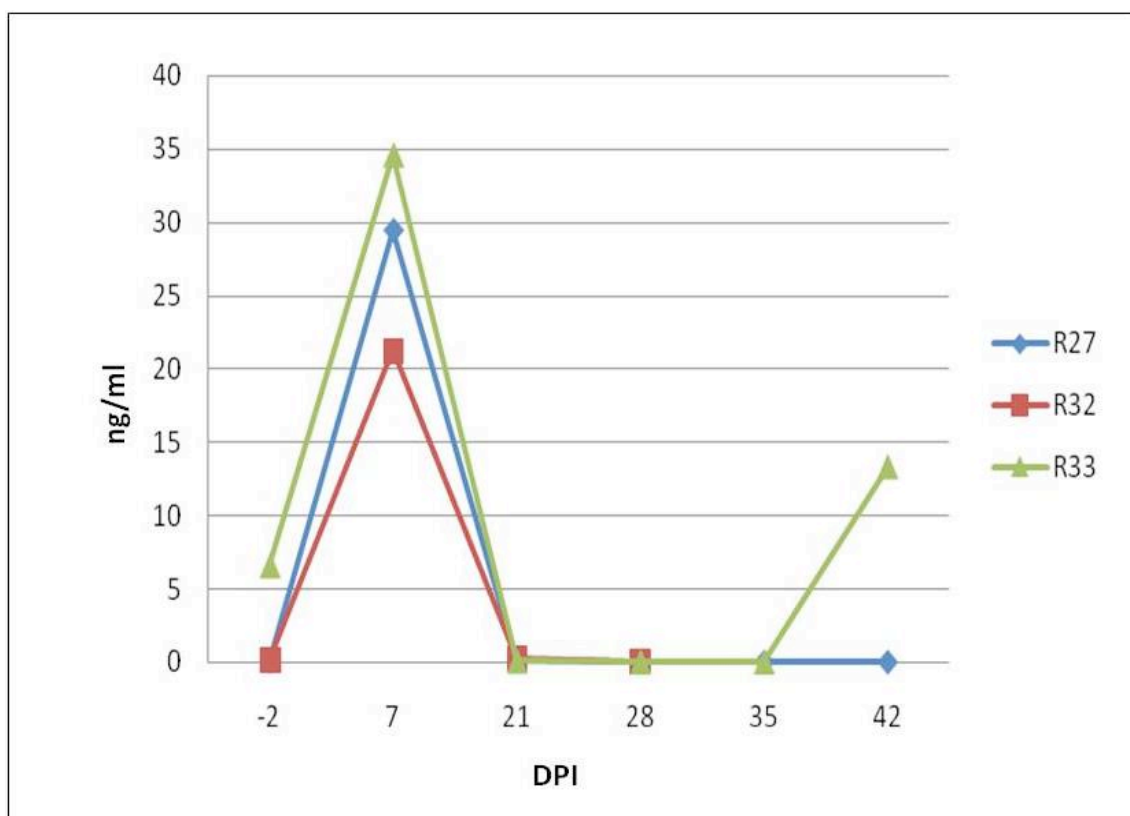


Grafico 3.1 - Scrofe non gravide: titolo sierico del Progesterone (P4).

3.3.2 Risultati sierologici e virologici *intra vitam*

Al -2 DPI nessun soggetto è risultato viremico per PPV, ADV, PRRSV e non è stato evidenziato nessun incremento dei titoli sierologici per gli stessi agenti infettivi nei prelievi eseguiti a inizio e fine sperimentazione.

Due giorni prima dell'inseminazione nessun soggetto presentava viremia per PCV2 mentre i titoli anticorpali anti-PCV2 erano elevati (intervallo 1:1000 -1:10000) in tutti gli animali, eccezion fatta per la scrofa I25 (1:100).

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

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) (Grafico 3.2). La scrofa I25, con basso titolo di anticorpi per PCV2, ha presentato viremia sia al 21° che al 35° DPI, 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° DPI, con segnale al 37° ciclo con un risultato di $2,93 \times 10^3$ copie genoma/ml).

Gli organi dei 6 animali infettati hanno evidenziato positività in RT-PCR in diversi tessuti: con valori oscillanti tra $1,01 \times 10^3$ 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).

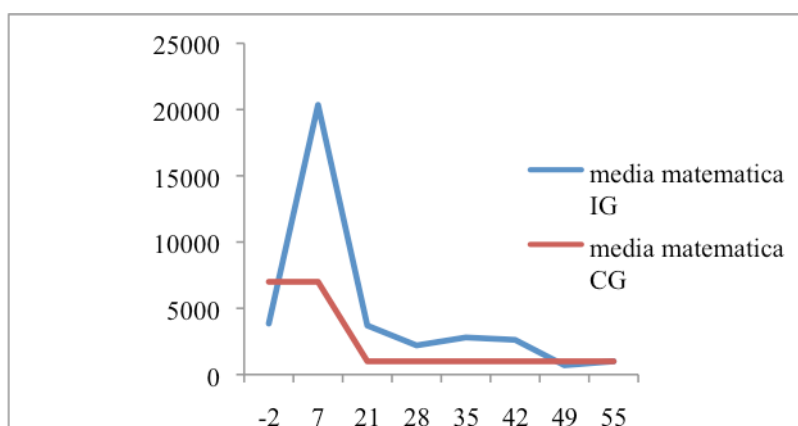


Grafico 3.2 - Andamento concentrazione sierica media degli anticorpi anti PCV-2 nel corso della fase sperimentale. (IG: gruppo infetto; CG: gruppo controllo; in ascissa viene espresso il giorno e in ordinata il titolo).

3.3.3 Risultati *post-mortem*

3.3.3.1 Lesioni macroscopiche

Alla necropsopia si sono osservate:

- pleurite cronica fibrosa di grado lieve-moderato in quattro animali: I26, I32, C28, C30;
- pericardite di grado lieve, cronica e fibrosa in I26 e C30 e sierosa in C31;
- polmonite enzootica bilaterale cranio-ventrale nella scrofa I29;
- peritonite siero-fibrinosa lieve in un solo caso: I27;
- epatite interstiziale cronica multifocale lieve (fegato a macchie bianche o “milk spotted liver”) in due casi: I32, C31.

Tre soggetti hanno presentato lievi erosioni multifocali a carico della mucosa cardiaca dello stomaco. Edema e congestione della mucosa sono state le sole lesioni uterine rinvenute durante la necropsopia di due soggetti (C30 e I33) non gravidi. Le scrofe gravide del gruppo I hanno presentato: 7, 11 e 16 feti, mentre i due animali di controllo 8 e 11 (Tabella 3.2).

Non sono state rilevate lesioni macroscopiche a carico dei feti.

Scrofa ID	Scrofe gravide (gruppo I)			Scrofe non gravide (gruppo I)			Scrofe di controllo (gruppo C)		
	25	26	29	27	32	33	28	30	31
Numero dei feti	16	11	7	0	0	0	11	0 (3 aborti)	8
Titolo sierico per PCV2*	1/10 ²	1/10 ³	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁴	1/10 ³	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁴
Viremia al giorno**	21 e 35	-	21	7	28	-	-	-	-
Tonsilla	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Linfonodo uterino sinistro	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Linfonodo uterino destro	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Linfonodo tracheo-bronchiale	+	-	-	/	-	/	-	-	-
Cervice	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Feti (pos/tot.)	10/16	-	3/7	-	-	-	-	-	-
Liquido amniotico (pos/tot.)	-	1/11	-	-	-	-	-	-	-
Feto e tratto uterino corrispondente (sinistro)	8***	-	-	-	-	+	-	-	-
Feto e tratto uterino corrispondente (destra)	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 3.2 - Tessuti e feti testati in RT-PCR e relativi risultati;* si riferisce al titolo sierico per PCV2 ad inizio sperimentazione; ** viene indicato il giorno/i di prelievo dopo la inseminazione; * dei 16 tratti uterini, corrispondenti ognuno ad un feto, in 8 campioni la PCR per l'utero era positiva, ma solo in 7 casi vi era concordanza tra positività nell'utero e nel feto.**

3.3.3.2 *Lesioni microscopiche*

Microscopicamente, in una sola placenta della scrofa I25, risultata positiva in RT-PCR per PCV2 con il più alto titolo virale ($>10^8$ copie genoma/ml), si è osservata una necrosi coagulativa focale dell'epitelio del corion (Foto 3.6a, Foto 3.6b).

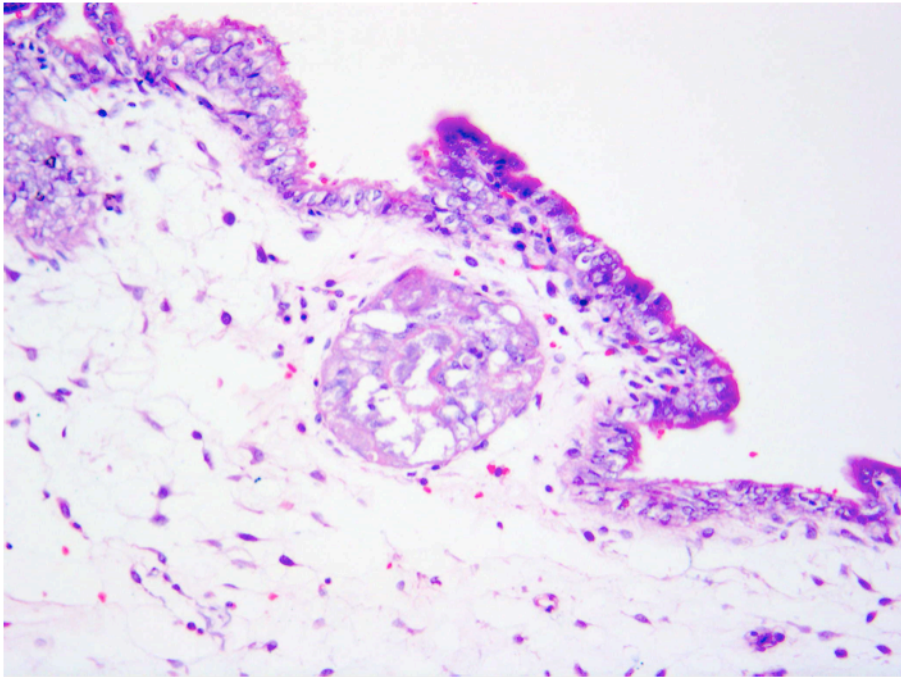


Foto 3.6 - a: corion feto n° 16, scrofa I25. Necrosi focale coagulativa dell'epitelio del corion (EE Ob. 10X).

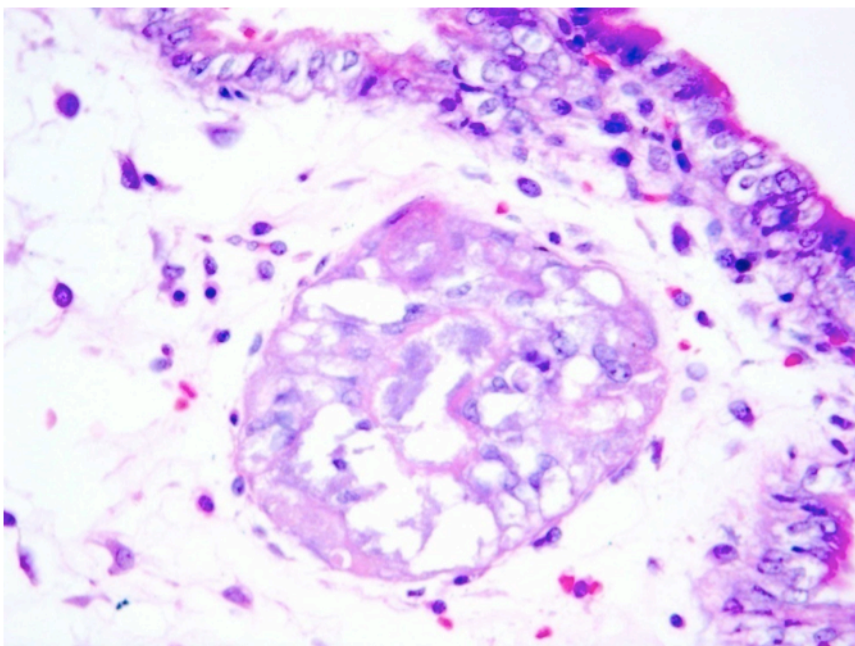


Foto 3.6 - b: particolare della foto 6a (EE ob. 40X).

Alcune cellule del corion hanno mostrato positività immunoistochimica, d'intensità lieve, per PCV2, con segnale localizzato a livello citoplasmatico (Foto 3.6c, Foto 3.6d).

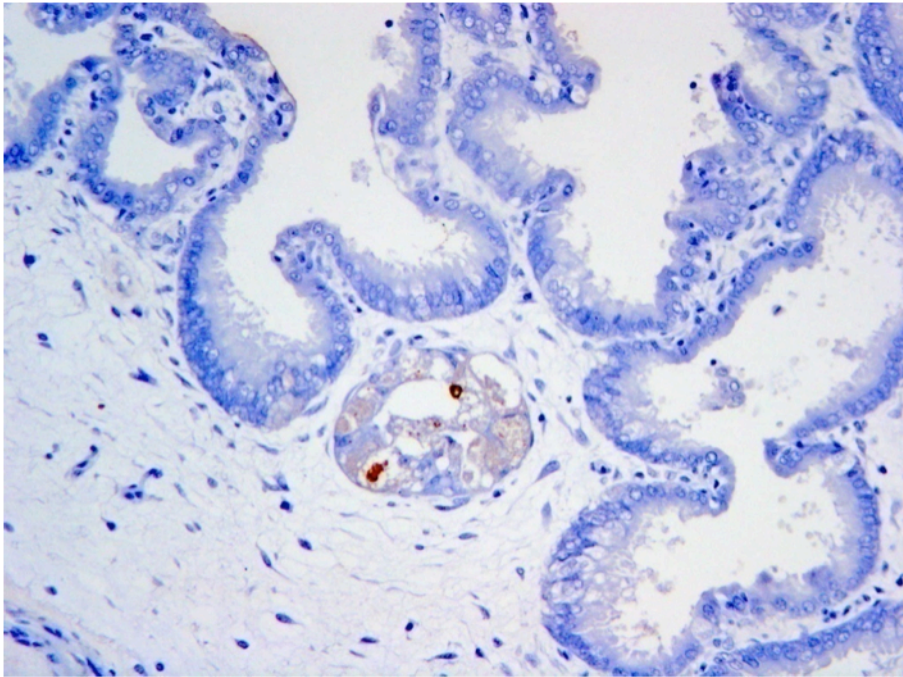


Foto 3.6 - c: corion feto n° 16, scrofa I25. Positività immunoistochimica per antigene PCV-2 nell'epitelio del corion. (Immunoistochimica. Ob. 10X).

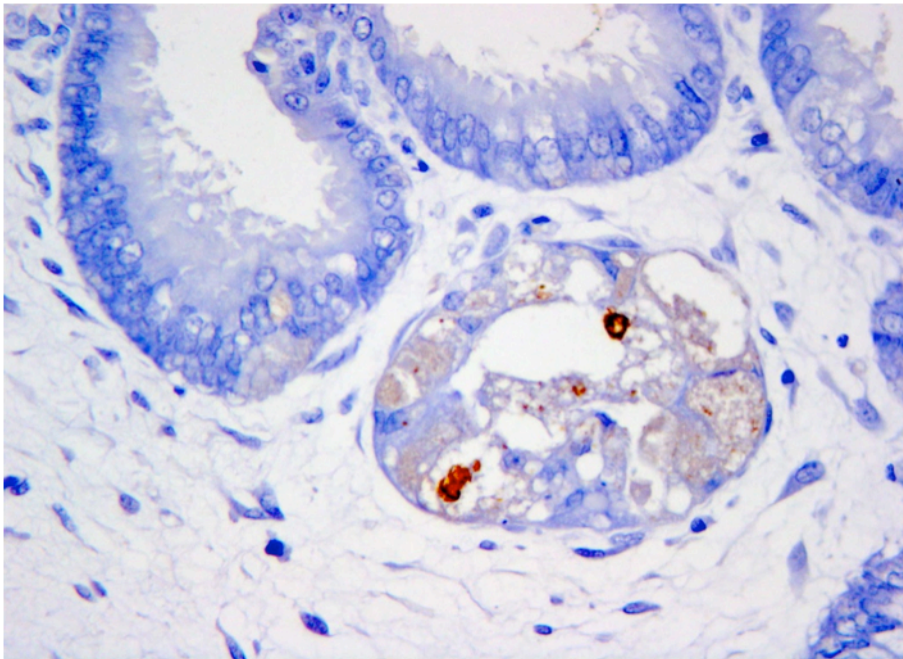


Foto 3.6 - d: particolare della foto 6c, notare la positività immunoistochimica lieve a livello citoplasmatico (Immunoistochimica. Ob. 40x).

Inoltre, nel feto corrispondente, si è registrata debole immunopositività per lo stesso agente nel citoplasma di alcuni epatociti (Foto 3.7).

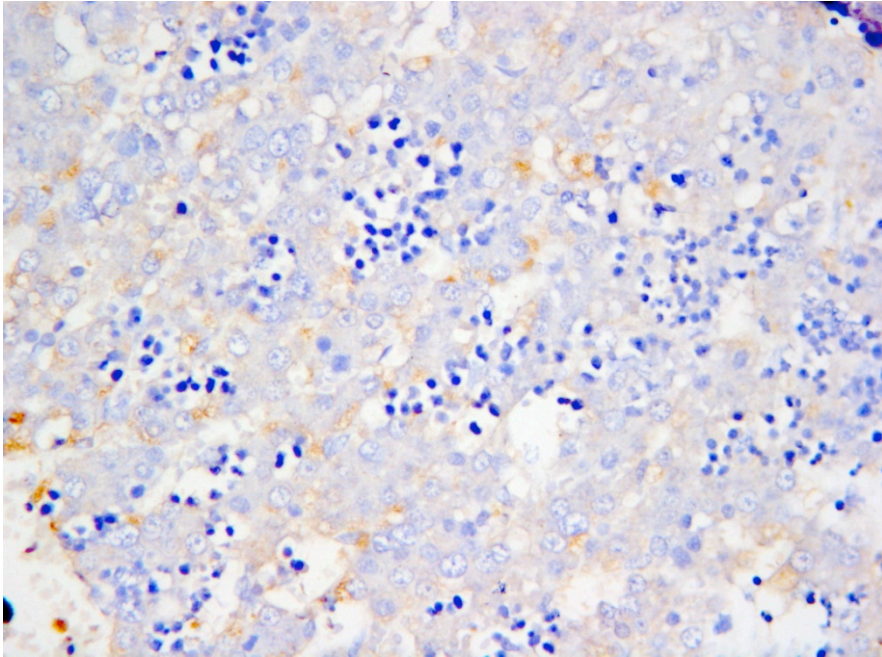


Foto 3.7 - Fegato feto n° 16, scrofa I25. Debole positività immunoistochimica nel citoplasma degli epatociti. (Immunoistochimica. Ob. 40X).

3.4 DISCUSSIONE

Il presente studio ha dimostrato la possibilità di trasmissione dell'infezione da PCV2 a scrofe convenzionali mediante l'impiego di seme infetto: 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 estro e nessun segno evidente di aborto) a differenza delle scrofe di controllo, le quali sono rimaste tutte gravide anche se una di loro 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° DPI, 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 a un evento viremico primario. Le viremie nei

soggetti infetti sono state registrate piuttosto tardivamente (prevalentemente dal 21° DPI 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.* (2005), 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. Questo si verifica in quanto 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 ° DPI e 35° DPI) 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. Inoltre, i risultati prodotti sembrano dimostrare che PCV2 non 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 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'IHC si ha per campioni con una carica virale maggiore di 10^8 copie di genoma PCV2/500ng DNA, come esattamente avvenuto nell'unico caso positivo all'IHC osservato nel presente lavoro.

3.5 CONCLUSIONI

Lo studio ha permesso di dimostrare che:

- l'esposizione intrauterina di seme infetto con PCV2 in scrofe convenzionali può riprodurre l'infezione;
- un basso titolo anticorpale della scrofa aumenta la probabilità d'infezione, dimostrando un ruolo protettivo degli anticorpi anti-PCV2 anche qualora la via d'ingresso sia quella endouterina;
- l'infezione da PCV2, contestualmente alla fecondazione, sembra ridurre la probabilità di gravidanza;
- il substrato anatomoistopatologico della sofferenza fetale va individuato anche in lesioni placentali (peraltro raramente le placenti sono conferite per la diagnosi);
- la metodica immunocistochemica è sufficientemente sensibile nei casi di turbe riproduttive acute mentre in quelle croniche il metodo più indicato è la RT-PCR.

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 informazioni cruciali per la pianificazione di misure di controllo volte a controllare l'infezione e minimizzare i danni.

Dai dati emersi in questo studio risulta critico il livello anticorpale della popolazione in esame.

Produzione scientifica personale

- 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 infettato con circovirus suino tipo2 (PCV2)”. XXXVI Congresso SIPAS (Societa’ Italiana Patologia e Allevamento Suini), 25-26 Marzo, Montichiari, Brescia (Italia). pp. 254-263.
- G. Sarli, F. Morandi, S. Panarese, B. Bacci, **D. Ferrara**, L. Fusaro, M.L Bacci, G. Galeati, M. Dottori, P. Bonilauri, D. Lelli , G. Leotti, T. Vila, F. Joisel, F. Ostanello: “Conventional sows inseminated with artificially PCV2 infected semen: **I. In vivo results**”,
 - Proceeding of the 21th International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver, Canada, 2010; 458; **poster presentation**;
 - Proceedings of the 2nd European Symposium on Porcine Health Management, Hannover, Germany, 2010; 77.
- - F. Morandi, B. Bacci, S. Panarese, **D. Ferrara**, L. Fusaro, M.L Bacci, M. Dottori, P. Bonilauri, G. Leotti, T. Vila, F. Joisel, F. Ostanello, G. Sarli,: “Conventional sows inseminated with artificially PCV2 infected semen: II. Post mortem results”,
 - Proceeding of the 21th International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver, Canada, 2010; 283; **oral presentation**;
 - Proceedings of the 2nd European Symposium on Porcine Health Management, Hannover, Germany, 2010; 78.
- Giovanna Galeati, Augusta Zannoni, Serena Panarese, Marcella Spinaci, Diego Bucci, Federico Morandi, **Domenico Ferrara**, Giorgio Leotti, Thais Vila, Joisel Francois, Fabio Ostanello, Giuseppe Sarli: “PCV2 detection in in vitro produced blastocysts after virus sperm exposure”, Proceeding of the 5th International Asian Pig Veterinary Society, Pattaya, Thailand, 2011; OR046; **oral presentation**.
- - F. Morandi, B. Bacci, S. Panarese, **D. Ferrara**, L. Fusaro, M.L Bacci, M. Dottori, P. Bonilauri, G. Leotti, T. Vila, F. Joisel, F. Ostanello, G. Sarli,: “Conventional gilts inseminated with artificially PCV2 infected semen”, Inviata a Reproduction in Domestic Animals.

Bibliografia

- Bielansky A., Larochelle 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." *Can Vet J*, 42: 548-550.
- Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Merialdi 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 IM, Moldal T, Jonassen CM. (2004) "Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR." *J. Virol. Methods*, 122 (2): 171-8.
- Calsamiglia M., Fraile L., Espinal A., Cuxart A., Seminati C., Martin M., Mateu E., Domingo M., Segalés J. (2007). Sow porcine circo virus 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., 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.
- Cordioli, P., Sala, G., Brocchi, E., Gamba, 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., Gaiadella L., Rosignoli C., Cantoni A.M., Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., Faccini S., Costa A., Leotti G., Cabassi E.: Infezione da porcine circo virus tipo 2 (PCV2) e aborto. *Atti XXX Meeting Annuale SIPAS*, 215-221, 2004.
- 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.
- 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*, 1-6.
- Hafez ESE, Hafez B. (2000) “Reproductive cycles” in “Reproduction in farm animals-7th Edition” di Hafez ESE, Hafez B ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Harms P. (1999). “Hepatopathology associated with spontaneous tupe-2 porcine circovirus infection in caesarean derived/colostrum deprived pigs.” *Proc. of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, vol. 42, 4.

- 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., Pedersen 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 polymorphisms. *Biologicals* 20,187-195.
- 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.
- 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.
- 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.
- Madson D.M., Patterson A.R., Pal N., Ramamoorthy S., Meng X.J., Opriessnig T. (2009) "Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2 (PCV2)." *Vet Pathol.* 46:707-716.
- 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.
- 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, 75-80.
- 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 MB, Sanchez RE Jr, Ladekjaer-Mikkelsen AS, Allan GM, Nauwynck HJ. (2004). “Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection.” *Vet Microbiol.* 98 (2): 175-83.
- 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. In: *Proc. 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology*, pp. 253–254.

- Sanchez R.E., Meerts P., Nauwynck H.J., Penseart M.B. (2003). Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early post-natal life. *Vet. Microbiol* 95, 15-25.
- Sarli G, Ostanello F, Morandi F, Fusaro L, Gnudi M, Bacci B, Nigrelli A, Alberali 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.
- Segales J., Allan G.M., Domingo M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Review* 6, 119-142.
- Segalés J., Rosell C., Domingo M. (2004). “Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease.” *Vet Microbiol*, 98 (2): 137-149.
- Schmoll F., Lang C., Steinrigl A.S., Schulze K., Kauffold J. (2008). Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 69, 814-821.
- Tamanini C., Bono G., Cairoli F., Chiesa F. (1985). Endocrine responses induced in anestrus goats by the administration of different hormones after fluoregestone acetate treatment. *Anim Reprod Sci* 9, 357-364.
- - West K.H., Bystrom J.M., Wojnarowicz C., Shantz N., Jacobson M., Allan G.M., Haines D.M., Clark E.G., Krakowka S., McNeilly 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.

4 INFEZIONE SPERIMENTALE CON SEME PCV2 POSITIVO IN SCROFE CONVENZIONALI VACCINATE E NON VACCINATE

4.1 INTRODUZIONE

Il PCV2, come osservato nei capitoli precedenti, è l'agente eziologico responsabile di una serie di patologie tra cui quelle che investono la sfera riproduttiva (Opriessnig *et al.*, 2007).

Nei suini in genere provoca infezioni subcliniche, mentre la malattia si manifesta clinicamente in una piccola percentuale di casi.

La già dimostrata trasmissione verticale del PCV2 conduce sporadicamente a problemi riproduttivi con aumento di feti nati morti e mummificati o, più spesso, a infezioni subcliniche di suinetti nati vivi al parto responsabili spesso della trasmissione orizzontale all'interno dell'allevamento (Madson e Opriessnig, 2011). L'infezione prenatale da PCV2 da sola non induce PMWS nel periodo post-natale nei feti infettati sperimentalmente, anche se coinfezioni e immunostimolazione potrebbero essere associate a PMWS nei suini in crescita (Ha *et al.*, 2008). Recentemente, uno studio ha mostrato una prevalenza di viremia di PCV2 (199/499, 39%) in suinetti che non hanno ancora assunto il colostro, provenienti da allevamenti commerciali, senza evidenza di PCVAD, indicando che l'infezione subclinica in utero può essere un riscontro comune di campo (Shen *et al.*, 2010). Tuttavia, il significato di quest'osservazione è ancora poco chiaro.

E' per questo motivo che dopo aver eseguito un esperimento d'infezione in scrofe mediante fecondazione con seme infetto al fine di studiarne l'impatto sulla infezione dei feti (Capitolo 3) si è deciso di ripetere l'esperimento precedente impiegando anche un gruppo di soggetti vaccinati verso PCV2.

Tale studio si è prefisso di valutare se la bassa immunità umorale naturale possa rappresentare o meno un'importante facilitazione nella riproduzione dell'infezione e se l'omogeneità del titolo

anticorpale indotto dalla vaccinazione confrontato con la condizione di eterogeneità dello stesso nell'immunizzazione naturale, rappresenti un fattore importante nella riduzione della possibilità di sviluppare infezione con PCV2 mediante seme infetto.

4.2 MATERIALI E METODI

Le metodologie applicate per questa sperimentazione ricalcano quelle impiegate nell'esperimento riportato nel capitolo 3, con l'eccezione del protocollo vaccinale. Si riportano comunque per completezza della presentazione.

4.2.1 Benessere animale

Il protocollo sperimentale per questo studio ha ricevuto la verifica e l'approvazione da parte del Comitato Etico e Scientifico dell'Università di Bologna.

Gli animali sono stati utilizzati in accordo con la Direttiva 86/609/CEE recepita dal D.Lgs. n° 116 del 27 Gennaio 1992 riguardante la protezione degli animali usati per fini sperimentali o altri scopi scientifici.

Il numero minimo di animali è stato utilizzato nel rispetto della normativa vigente, della "legge delle 3R" e della integrità scientifica dell'elaborato.

Gli animali sono stati manipolati esclusivamente da medici veterinari o da personale accuratamente addestrato.

4.2.2 Animali e stabulazione

Quindici scrofe, di circa 5 mesi d'età, clinicamente sane e di razza Large White, sono state scelte con metodo randomizzato tra 35 soggetti presenti in un allevamento commerciale convenzionale nel quale non è stata eseguita vaccinazione per PCV2 e sono state etichettate individualmente attraverso una marca auricolare.

Sei di loro sono state vaccinate con CIRCOVAC® (vaccino per la circovirosi del suino, Merial, Lione, Francia) con due interventi 8 (il primo) e 4 (il secondo) settimane prima della fecondazione.

Le quindici scrofe sono state poi trasferite presso gli stabulari del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna.

Al momento dell'arrivo un medico veterinario ha preso visione del Modello 4 (dichiarazione di provenienza e di destinazione degli animali) e visitato i singoli animali facendo particolare attenzione alla presenza di problemi comportamentali e di eventuali segni di diarrea o di patologie respiratorie.

Le quindici scrofe sono state arruolate nello studio e pesate singolarmente: la media e la deviazione standard erano rispettivamente 83,5 kg e 9,3 kg di p.v.

Le scrofe dopo un periodo di acclimatamento di 28 giorni sono state nuovamente pesate mostrando una media e una deviazione standard rispettivamente di 98,5 kg e 9,4 kg. I pesi dei singoli animali, le medie e le rispettive deviazioni standard dei vari gruppi, dopo il periodo di acclimatamento, sono presenti in Tabella 4.1.

Gruppo	Numero	Peso	Media	Deviazione standard
IV	108	91,40	99,75	10,44
	109	97,60		
	110	91,50		
	112	116,50		
	114	108,50		
	115	93,00		
INV	117	94,00	99,00	6,60
	118	94,40		
	119	94,50		
	123	110,70		
	126	97,80		
	127	102,60		
CTR	116	94,80	87,77	6,10
	120	84,00		
	122	84,50		

Tabella 4.1 - Peso degli animali appartenenti ai gruppi: infetto vaccinato (IV), infetto non vaccinato (INV) e controllo (CTR) dopo acclimatamento.

Gli animali sono stati divisi, secondo un criterio randomizzato, in 3 gruppi (vedi Tabella 1):

- gruppo di controllo (gruppo “CTR”): 3 soggetti (CTR 116, CTR 120, CTR 122) non vaccinati e fecondati con seme non esposto a PCV2;
- gruppo di infetti (gruppo “INV”): 6 soggetti (INV 117, INV 118, INV 119, INV 123, INV 126, INV 127) non vaccinati e fecondati con seme sperimentalmente esposto a PCV2;
- gruppo di vaccinati (gruppo “IV”): 6 soggetti vaccinati (IV 108, IV 109, IV 110, IV 112, IV 114, IV 115) e infettati con seme sperimentalmente esposto a PCV2.

Ciascun gruppo è stato stabulato in un locale dedicato per evitare problemi di contaminazione crociata.

Gli animali sono stati tenuti in uno stabulario con accesso limitato al solo personale autorizzato e sono state osservate rigorose norme di biosicurezza: ogni contatto con i soggetti sani e infetti è avvenuto previo utilizzo di dispositivi di protezione individuali monouso da parte degli operatori.

Nei tre locali temperatura e umidità sono state controllate costantemente per ridurre al minimo un possibile stress termico ed è stato rispettato un fotoperiodo artificiale con 10 ore di luce (8:00-18:00) e 14 di buio (18:00-8:00). Ciascun animale, durante tutto lo studio sperimentale, è stato stabulato in un box singolo (2,7 x 2,7 m) per fornire allo stesso un’adeguata superficie di esterizzazione delle proprie caratteristiche comportamentali e di produzione.

Ogni box è stato dotato di una mangiatoia a terra e di un abbeveratoio a succhiotto collegato alla rete idrica municipale. Il singolo soggetto è stato alimentato due volte al giorno con una razione di mangime da gestazione.

Contestualmente alla somministrazione di alimento si è provveduto al rilievo della temperatura rettale (Foto 4.1) e alla osservazione/registrazione della presenza di eventuali segni clinici e/o di ritorno in calore.



Foto 4.1 - Misurazione della temperatura rettale dell'animale.

4.2.3 Preparazione del PCV2 utilizzato per l'inseminazione

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 sottoposto a sequenziamento genotipico come riportato da Hesse *et al.* (2008). 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.

4.2.4 Preparazione del materiale seminale utilizzato per l'inseminazione

Il materiale seminale è stato prelevato attraverso la tecnica della “mano guantata” da un verro di razza Large White presente nello stabulario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

Esso è stato esaminato per valutarne le caratteristiche di concentrazione, motilità e compatibilità con il medium diluitore del virus. Inoltre il seme è stato saggiato attraverso una RT-PCR onde escludere la presenza di DNA del PCV2.

Sono state quindi preparate 15 dosi di materiale seminale, ciascuna costituita da 3×10^9 spermatozoi/100 ml, in Androhep EnduraGuard (Minitube, Tiefenbach, Germany). Dodici dosi sono state addizionate con 10 ml di sospensione virale (gruppi INV e IV) e tre dosi con 10 ml di medium privo di virus (gruppo CTR). Le dosi sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente prima della IA.

4.2.5 Protocollo sperimentale

Dopo un periodo di acclimatamento di 28 giorni si è proceduto alla sincronizzazione-superovulazione dell'estro nelle scrofette mediante:

- somministrazione per via intramuscolare di eCG alla dose di 1500 UI/scrofa (Folligon®-Intervet),
- dopo 60 ore da questa, somministrazione per via intramuscolare di hCG alla dose di 750 UI/scrofa (Corulon®-Intervet).

Quaranta ore più tardi gli animali sono stati inseminati, utilizzando un catetere tipo Melrose sterile, con una singola dose: le 12 scrofe dei gruppi INV e IV hanno ricevuto seme infettato sperimentalmente mentre i 3 animali del gruppo CTR hanno ricevuto il seme addizionato del solo medium.

A distanza di 20-21 giorni dall'inseminazione i soggetti sono stati controllati accuratamente per rilevare eventuali ritorni in calore.

Al 29° giorno di gestazione, onde confermare la gravidanza, tutti gli animali presunti gravidi sono stati sottoposti ad esame ecografico (Foto 4.2).

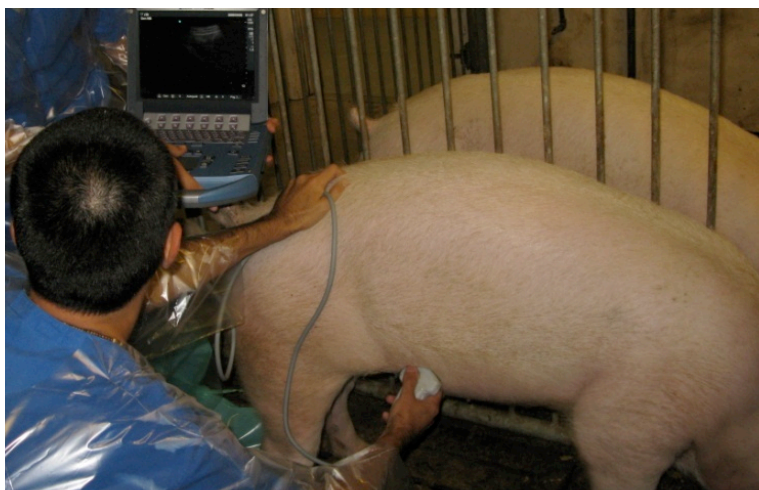


Foto 4.2- Esecuzione di un esame ecografico per la diagnosi di gravidanza.

Gli animali che hanno abortito e quelli risultati non gravidi all'esame ecografico sono stati sottoposti ad eutanasia, rispettivamente 1-2 giorni successivi all'aborto o nei giorni immediatamente successivi all'esame ecografico.

Gli animali gravidi sono stati sottoposti ad eutanasia tra il 49° a il 55° DPI.

Il protocollo farmacologico utilizzato per l'eutanasia è stato il seguente:

- premedicazione: somministrazione IM di Azaperone (Stresnil® - Janssen Animal Health, Beerse, Belgium) seguita dopo 20 minuti da Ketamina (Ketavet100® - Intervet Productions S.r.l., Milan, Italy)
- induzione, dopo 20 minuti, con Tiopentale sodico 50 mg/ml per via EV (Pentothal Sodium Intervet Productions S.r.l., Milan, Italy)

immediatamente dopo, somministrazione EV di Tanax (Tanax® - Intervet Italia, Latina, Italy).

4.2.6 Campionamento *in vivo*

Due giorni prima della fecondazione (giorno -2), da ciascuna scrofa sono stati eseguiti:

- tamponi vaginali, nasali e rettali (Foto 4.3),
- prelievi ematici.



Foto 4.3 - Esecuzione di un tampone rettale.

Successivamente gli stessi campionamenti sono stati eseguiti con cadenza settimanale fino al 55° DPI. Al fine di non interferire con il riconoscimento materno di gravidanza (13°÷18° DPI), le scrofette non sono state sottoposte a prelievo ematico il 14° DPI (Hafez *et al.*, 2000). Lo schema del campionamento è riportato in Tabella 4.2.

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

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 del sacrificio della singola scrofa è stata condotta anche la ricerca di anticorpi anti PPV, ADV e PRRSV.

Al fine di monitorare lo stato riproduttivo (estrale o di gravidanza), in tutte le scrofe è stata valutata la concentrazione del progesterone ematico nell'arco di tempo compreso tra l'inizio della sperimentazione ed il 28° DPI, ad eccezione delle scrofe non gravide, testate fino al giorno del sacrificio.

	ID	DPI																			
		-2	7	14	21	22	23	25	28	30	33	34	35	42	48	49	50	51	54	55	
IV	108	B+S	B+S	S	B+S				B+S				B+S	B+S	B+S					B+S	
	109	B+S	B+S	S	B+S				B+S			B+S									
	110	B+S	B+S	S	B+S		B+S														
	112	B+S	B+S	S	B+S			B+S													
	114	B+S	B+S	S	B+S				B+S				B+S	B+S	B+S	B+S					
	115	B+S	B+S	S	B+S				B+S				B+S	B+S	B+S		B+S				
INV	117	B+S	B+S	S	B+S				B+S		B+S										
	118	B+S	B+S	S	B+S				B+S		B+S										
	119	B+S	B+S	S	B+S				B+S				B+S	B+S	B+S				B+S		
	123	B+S	B+S	S	B+S				B+S	B+S			B+S	B+S	B+S	B+S					
	126	B+S	B+S	S	B+S	B+S															
	127	B+S	B+S	S	B+S				B+S				B+S	B+S	B+S						B+S
CTR	116	B+S	B+S	S	B+S				B+S	B+S											
	120	B+S	B+S	S	B+S				B+S				B+S	B+S	B+S					B+S	
	122	B+S	B+S	S	B+S				B+S				B+S	B+S	B+S						B+S

Tabella 4.2 - Schema temporale dei campionamenti ematici (B) e tamponi vaginali, nasali e rettali (S).

4.2.7 Campionamento *post-mortem*

Ogni scrofa è stata sottoposta a un accurato e approfondito esame necroscopico volto a evidenziare la presenza di lesioni macroscopiche.

Da ciascuna scrofa sono stati prelevati campioni dei seguenti organi: tonsille, milza, linfonodi (inguinali superficiali, uterini, mesenterici e tracheo-bronchiali), duodeno, digiuno, ileo, cuore, mucosa nasale, trachea, polmone, fegato, rene, ovaie, salpingi, utero e vagina.

Gli apparati riproduttori dei soggetti gravidi sono stati esaminati sul tavolo anatomopatologico: si è provveduto all'isolamento e al prelievo di tratti di placenta in corrispondenza del singolo feto con prelievo sterile del liquido amniotico (Foto 4.4).

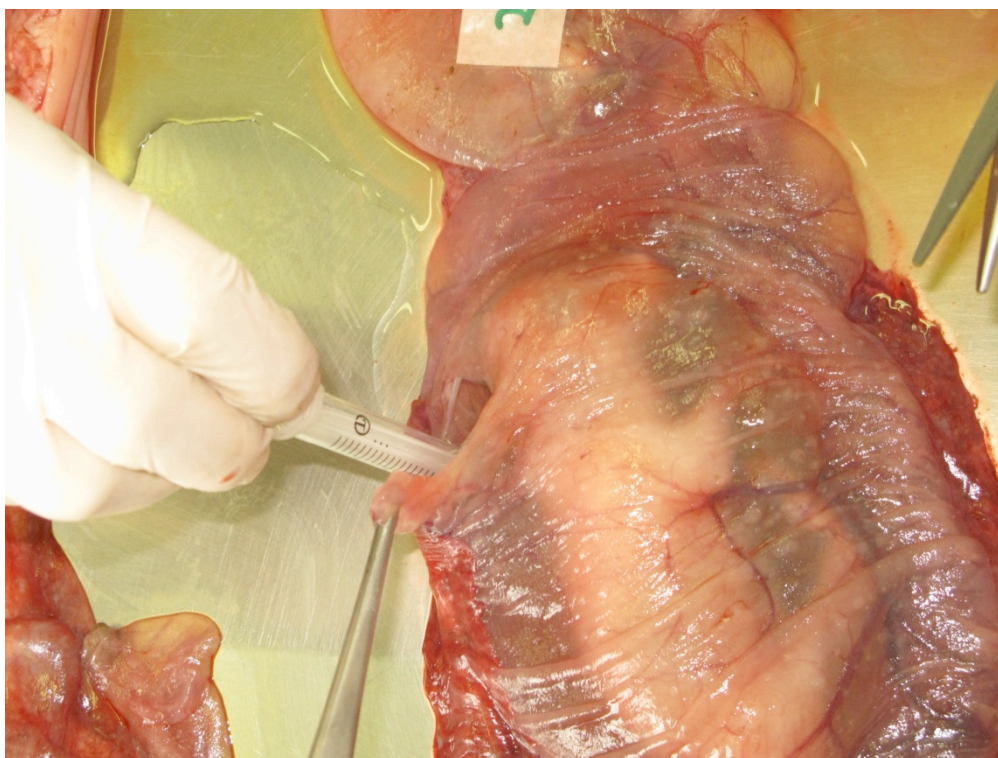


Foto 4.4 - Prelievo sterile del liquido amniotico.

I feti invece sono stati inizialmente esposti e conseguentemente numerati a partire dall'apice del corno sinistro.

Da ciascuno di questi feti sono stati inoltre prelevati campioni di fegato, milza e cuore.

Aliquote speculari di ciascun campione sono state utilizzate per:

- ricerca del genoma virale mediante RT-PCR e PCR qualitativa;
- indagine istopatologica ed immunohistochimica per PCV2.

4.2.8 Dosaggio progesterone

La valutazione del P4 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 e fatto evaporare sotto un getto di N₂,
- gli estratti ottenuti sono quindi stati risospesi in 1 ml di tampone fosfato testandone aliquote da 100 µl.

La sensibilità del saggio è stato pari a 1,0 pg/aliquota ed i risultati ottenuti sono stati espressi in ng/ml (Tamanini *et al.*, 1985). Il coefficiente di variazione intra- ed inter-saggio è stato rispettivamente del 6,3% e 8,6%. I risultati sono stati espressi in ng/ml.

Tali indagini sono state eseguite presso la sezione di fisiologia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

4.2.9 Metodica PCR

L'estrazione dell'acido nucleico di PCV2 dai diversi campioni (siero, tamponi e organi) è stata eseguita mediante Trizol LS (Invitrogen), in accordo con le istruzioni del produttore.

L'amplificazione è stata condotta in accordo con il protocollo proposto da Olvera *et al.* (2004).

I campioni sono anche stati testati ad inizio e fine esperimento per PRRSV, PPV, ADV (virus potenzialmente responsabili di turbe riproduttive) secondo protocolli descritti rispettivamente da Bonilauri *et al.* (2003), Katz e Pedersen (1992) e Kim *et al.* (2001); queste indagini sono state svolte presso la sezione di Reggio Emilia dell'IZSLER.

4.2.10 Indagini sierologiche

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).

4.2.11 Istologia ed immunoistochimica

I campioni istologici sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, processati e inclusi in paraffina. Sezioni di circa 4 μ m sono state ottenute e colorate con ematossilina ed eosina.

Sui tessuti fissati è stata anche realizzata una colorazione immunoistochimica con l'ausilio di anticorpi anti-PCV2 (Mab F217), alla diluizione di 1:200 in tampone fosfato, forniti dal Dott. Gordon Allan (Veterinary Sciences Division, Department of Agriculture and Rural Development, Belfast, UK), secondo il metodo descritto da Sarli *et al.* (2009) modificato utilizzando un complesso di rilevazione streptavidina-biotina-perossidasi polimerico (SuperPicture kit peroxidase, Zymed® Lab, San Francisco, USA) al fine di aumentarne la sensibilità.

Tale metodo ha previsto:

- l'inibizione delle perossidasi endogene: 0,3% di H₂O₂ in metanolo per 30 min a temperatura ambiente (TA),
- lo smascheramento dei siti antigenici: 0,05% di Protease XIV pH 7,5 per 15 min a 37°C,
- l'incubazione con anticorpo primario diluito 1:200 in tampone fosfato (PBS) per una notte a 5°C,
- il sistema di rilevazione streptavidina-biotina-perossidasi polimerico: Kit Dako (code K0690): Biotinylated link per 15 min più Streptavidin-HRP per 15 min a TA,

- la colorazione con una soluzione di cromogeno (DAB 0,02% e H₂O₂ 0,001% in PBS) per 10 min a TA,
- la colorazione di contrasto con Ematossilina di Papanicolau diluita 1:2 per 3 sec.

4.3 RISULTATI

4.3.1 Sincronizzazione, diagnosi di gravidanza e sacrificio degli animali

A quaranta ore dalla somministrazione di hCG, in tutte le scrofe (eccezion fatta per il CTR116) sono stati riscontrati segni di estro.

Durante il periodo compreso dal momento dell'inseminazione al 29° DPI tre scrofe (INV 126, IV 110 e IV 112) hanno abortito 2 o 3 embrioni al 20°, 22° e 24° DPI (Tabella 4.3) per cui si è previsto il loro sacrificio rispettivamente al 22°, 23° e 25° DPI (Tabella 4.5).

Le altre 12 scrofe sono state sottoposte, al 29° DPI, ad indagine ecografica, la quale ha confermato che otto scrofe (IV 108, IV 114, IV 115, INV 119, INV 123, INV 127, CTR 120 E CTR 122) erano gravide e quattro non gravide (IV 109, INV 117, INV 118 e CTR 116) (Tabella 4.3) come avvalorato anche dalle basse concentrazioni di P4 (Tabella 4.4). Nonostante i bassi livelli di P4 tali scrofe non presentavano al 21° DPI segni di estro.

Gruppo	Numero	Gravidanza		
		Prima dell'ecografia	Dopo l'ecografia	
IV	108			+
	109		-	
	110	+	*	
	112	+	*	
	114			+
	115			+
INV	117		-	
	118		-	
	119			+
	123			+
	126	+	*	
	127			+
CTR	116		-	
	120			+
	122			+

Tabella 4.3 - Stato di gravidanza (+) o non-gravidanza (-) dell'animale. Legenda: * = IV 110, IV 112 e INV 126 hanno abortito.

Come riportato nella figura sottostante le scrofe non solo non hanno mostrato nessuna variazione nel titolo di P4 dopo il 21° DPI ma, durante la necropsia, nessun segno di attività ciclica è stata rilevata a livello ovarico.

	DPI				# fetuses
	-2	7	21	35	
108	0,03	14,7	11,86	11,51	3
109	0,04	14,8	0,05	0,04	0
110	0,01	19,74	2,83		a
112	0,08	14,66	4,16		a
114	0,11	32,38	20,29	33,42	15
115	0,05	16,33	13,67	19,85	9

	DPI				# fetuses
	-2	7	21	35	
117	0,11	27,62	0,04	0,34	0
118	0,41	15,46	0,01	0,17	0
119	0,04	23,39	17,56	22,68	10
123	0,45	26,42	25,70	26,47	16
126	0,97	23,33	1,06		a
127	0,11	34,12	22,53	18,84	14

	DPI			# fetuses
	-2	7	21	
116	0,02	11,91	0,02	0
120	0,62	20,63	29,51	7
122	0,05	22,84	31,32	10

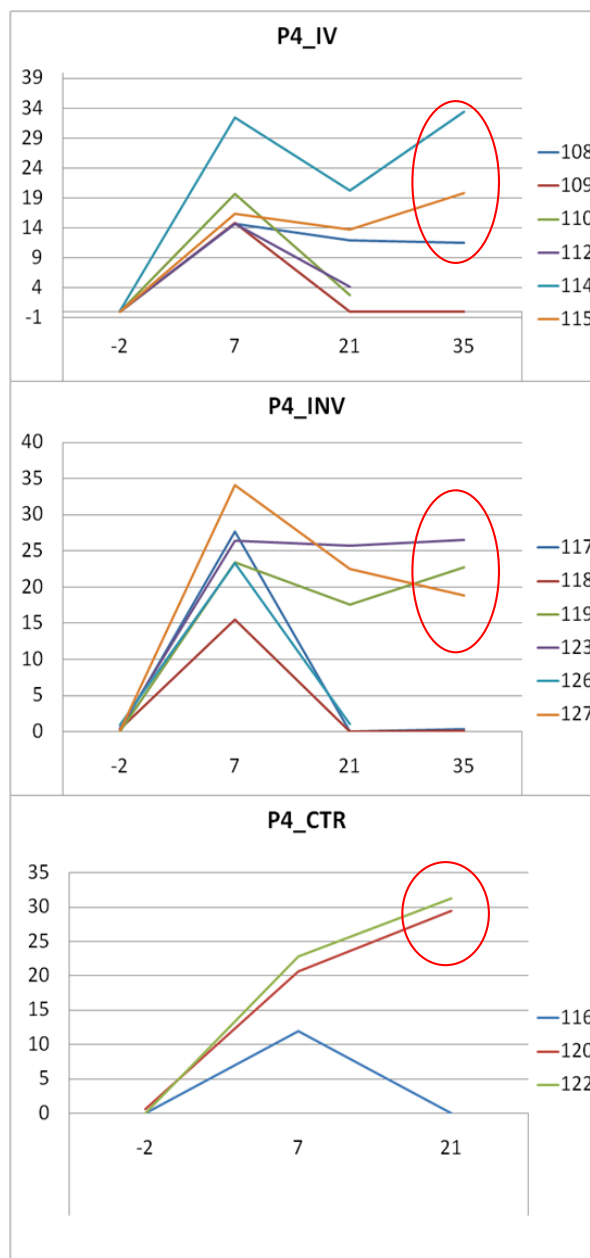


Tabella 4.4 - Titolo sierico del Progesterone (P4). In ascissa viene espresso il giorno e in ordinata la quantità in ng/ml.

Le quattro scrofe non gravide (IV 109, INV 117, INV 118 e CTR 116) sono state sacrificate rispettivamente a 34°, 33°, 33° e 30° DPI (Tabella 4.5).

Le rimanenti scrofe sono state sacrificate tra il 49° e 55° DPI secondo lo schema riportato in Tabella 4.5.

Gruppo	Numero	DPI del sacrificio											
		22	23	25	28	30	33	34	49	50	51	54	55
IV	108												
	109												
	110												
	112												
	114												
	115												
INV	117												
	118												
	119												
	123												
	126												
	127												
CTR	116												
	120												
	122												

Tabella 4.5 - DPI del sacrificio dell'animale.

4.3.2 Risultati sierologici e virologici *intra vitam*

Al -2 DPI nessun soggetto è risultato viremico per PPV, ADV, PRRSV e non è stato evidenziato nessun incremento dei titoli sierologici per gli stessi agenti infettivi nei prelievi eseguiti a inizio e fine sperimentazione. Anzi i titoli sierici anticorpali contro PPV, PRRSV e ADV hanno mostrato un decremento tra il -2° DPI e l'ultimo campionamento suggerendo la non presenza di un'infezione accidentale verso PPV, PRRSV e ADV durante tutto il periodo della sperimentazione.

Due giorni prima dell'inseminazione i titoli anticorpali anti-PCV2 erano elevati in tutti gli animali (Grafico 4.1).

L'andamento dei titoli anticorpali per PCV2 durante il periodo di sperimentazione ha evidenziato per il gruppo IV un più basso titolo anticorpale rispetto agli altri due gruppi (Grafico 4.1), anche se nei primi si è registrato il più basso numero di eventi viremici rispetto agli altri due gruppi.

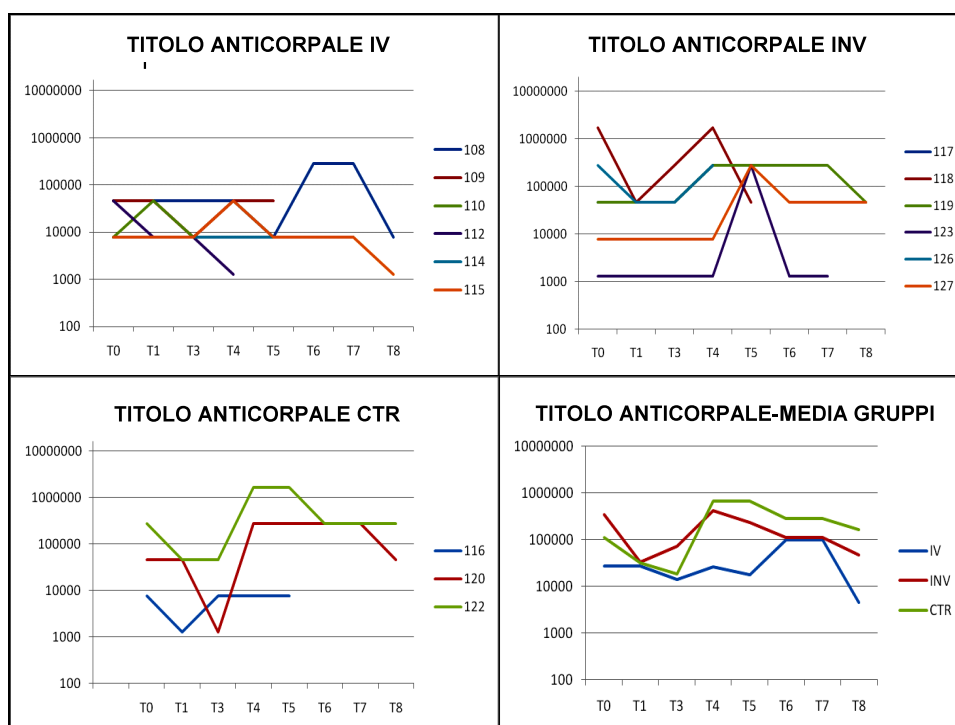


Grafico 4.1 - Misure del titolo anticorpale dei gruppi: infetto vaccinato (IV), infetto non vaccinato (INV), controllo (CTR) e la media di tutti e tre i gruppi. In ascissa viene espresso il tempo e in ordinata il titolo anticorpale.

Anche se non significativo il livello anticorpale del gruppo IV (range medio dei titoli: 1/6⁴-1/6⁷) era più basso di quello registrato dei gruppi INV e CTR (range medio dei titoli: 1/6⁴-1/6⁸).

La ricerca del genoma di PCV2 nel siero ha dato nel gruppo IV un più basso numero di soggetti positivi se confrontato con i gruppi INV e CTR (Tabella 4.6).

Gruppo	ID animale	Siero	Tampone fecale	Tampone vaginale	Tampone nasale
IV	108	-	000	00	0000
	109	-	00	00	00
	110	0	0	-	00
	112	-	0	0	0
	114	-	00	-	000
	115	0	000	0	0
INV	117	000	000000	00000	00000
	118	00000	000000	00000	000000
	119	00000000	000000000	000000	00000000
	123	00	0000000	000	000
	126	00	0000	0000	000
	127	0	000000	00	0000
CTR	116	0	0000	0000	000
	120	00	00000000	000	0000
	122	000000	00000000	00000000	000000000

Tabella 4.6 - Risultati della PCR nei campioni in vivo. O = campione positivo.

Nei grafici che seguono il numero di campioni positivi ed i valori di RT-PCR, eseguiti a cadenza settimanale, sono stati rappresentati separatamente per ogni animale e per il singolo gruppo.

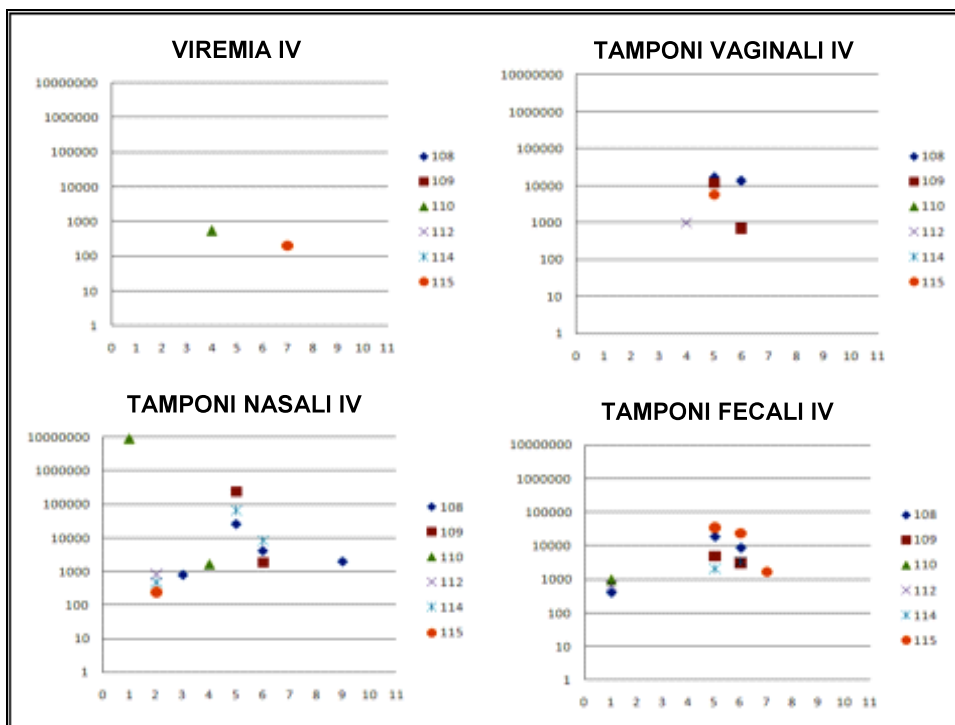


Grafico 4.2 - Risultati della RT-PCR per PCV2 nel gruppo IV.

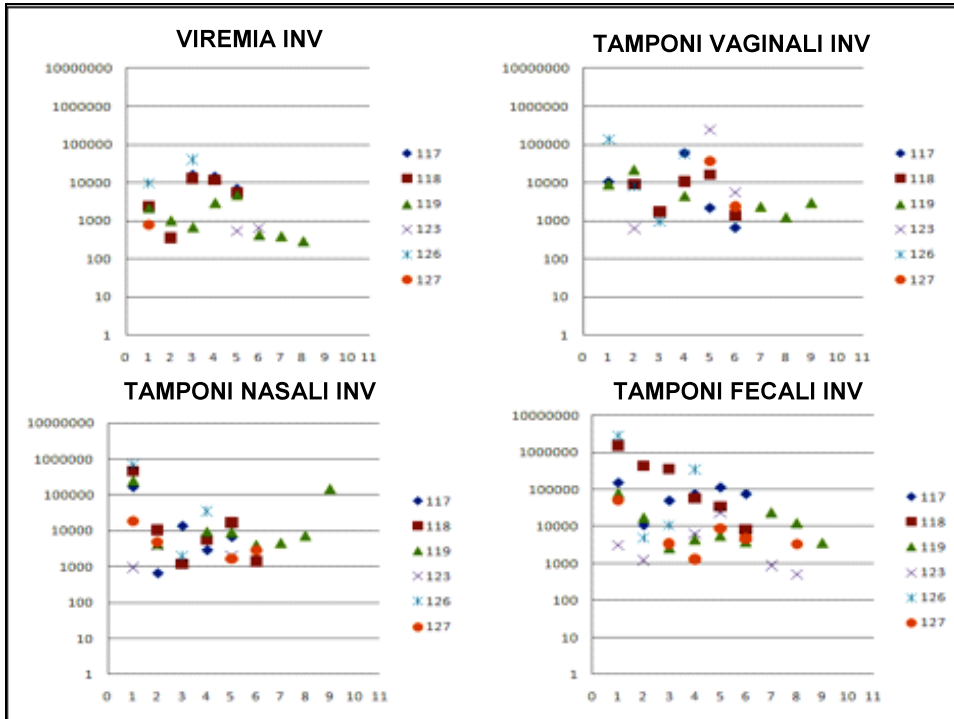


Grafico 4.3 - Risultati della RT-PCR per PCV2 nel gruppo INV.

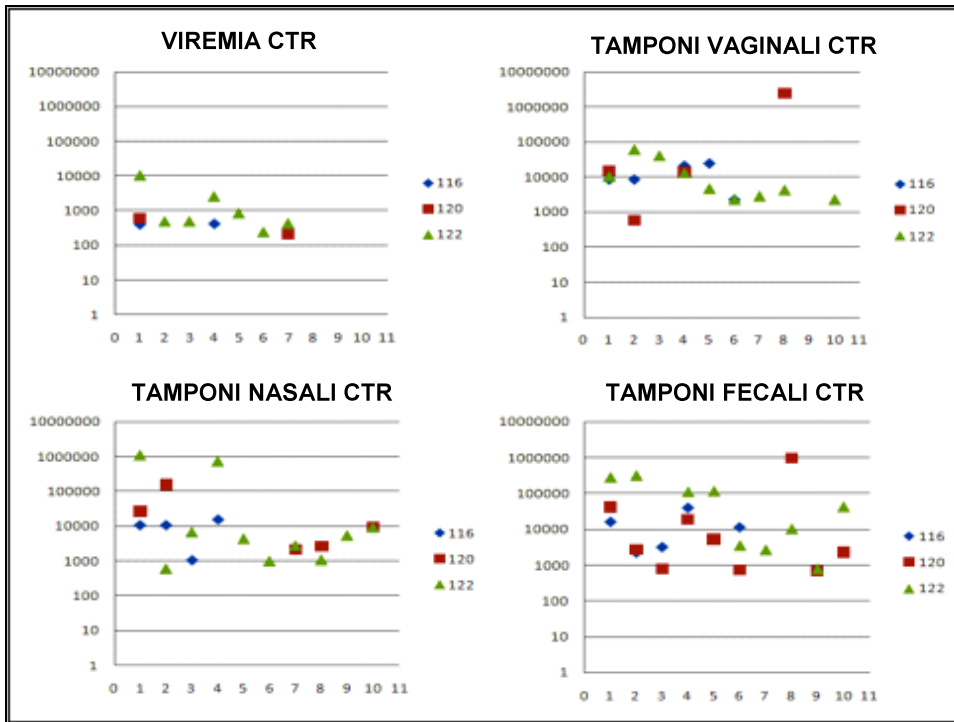


Grafico 4.4 - Risultati della RT-PCR per PCV2 nel gruppo CTR.

I risultati della PCR su sieri e tamponi (vaginali, nasali e rettali) sono riassunti nelle tabelle seguenti come rapporto tra RT-PCR positivi e numero totale dei campioni.

Tempo di campionamento siero	Gruppo		
	IV	INV	CTR
T0	0/6	4/6	1/3
T1	0/6	2/6	1/3
T3	0/6	4/6	2/3
T4	1/6	3/6	1/3
T5	0/4	4/5	1/3
T6	0/3	2/3	2/2
T7	1/3	1/3	0/2
T8	0/2	1/2	0/2
Totale	2/36	21/37	8/21

Tabella 4.7 - Sieri PCV2 PCR+/N°campioni.

Tempo di campionamento tampone vaginale	Gruppo		
	IV	INV	CTR
T0	0/6	3/6	3/3
T1	0/6	5/6	1/3
T2	0/6	2/6	3/3
T3	1/6	4/6	2/3
T4	3/6	4/6	2/3
T5	2/4	4/5	1/3
T6	0/3	1/3	2/2
T7	0/3	1/3	0/2
T8	0/2	1/2	1/2
Totale	6/42	25/43	15/24

Tabella 4.8 - Tamponi vaginali PCV2 PCR+/N°campioni.

Tempo di campionamento tampone nasale	Gruppo		
	IV	INV	CTR
T0	1/6	6/6	3/3
T1	3/6	5/6	2/3
T2	1/6	3/6	2/3
T3	1/6	4/6	1/3
T4	3/6	5/6	1/3
T5	3/4	3/5	2/3
T6	0/3	1/3	2/2
T7	0/3	1/3	1/2
T8	1/2	1/2	2/2
Totale	13/42	29/43	16/24

Tabella 4.9 - Tamponi nasali PCV2 PCR+/N°campioni.

Tempo di campionamento tampone rettale	Gruppo		
	IV	INV	CTR
T0	3/6	6/6	3/3
T1	0/6	5/6	2/3
T2	0/6	5/6	3/3
T3	0/6	6/6	2/3
T4	4/6	5/6	3/3
T5	4/4	5/5	1/3
T6	1/3	2/3	2/2
T7	0/3	3/3	2/2
T8	0/2	1/2	2/2
Totale	12/42	38/43	20/24

Tabella 4.10 - Tamponi rettali PCV2 PCR+/N°campioni.

Il test del Chi quadrato ha messo in evidenza una significativa differenza nella frequenza dell'eliminazione del virus e nella viremia tra IV da una parte e INV e CTR dall'altra (Chi Square = 71,35; P<0,001).

Infatti è possibile osservare dai grafici che il gruppo IV mostra un numero di campioni PCR+ di gran lunga inferiori rispetto agli altri due gruppi (33/162 dell'IV vs 103/166 dell'INV e 59/93 del CTR).

4.3.3 Risultati *post-mortem*

4.3.3.1 Lesioni macroscopiche

Al tavolo anatomopatologico, le sole lesioni, che è stato possibile rilevare sono:

- pleurite fibrosa cronica focale da lieve a moderata in quattro animali: IV 108, IV 109, INV 118 e INV 119,
- broncopolmonite cranio-ventrale bilaterale cronica di grado lieve riconducibile ad una polmonite enzootica in tre animali: IV 114, INV 119 e CTR 116,
- epatite interstiziale cronica multifocale di grado lieve è stata osservata in tre soggetti: IV 115, INV 118 e CTR 122,
- gastrite ulcerosa multifocale cronica della "pars oesophagea" di grado lieve-moderato in quattro soggetti: IV 114, INV 127, CTR 120 e CTR 122.

Non era evidente nessuna differenza significativa tra i gruppi.

La valutazione degli organi riproduttivi ha mostrato che IV 110, IV 112 e INV 126 (soggetti che hanno abortito rispettivamente al 22°, 24° e 20° DPI), presentavano un utero coerente con uno "stato endocrinologico progestinico". Nelle ovaie pochi e piccoli corpi albicanti erano coerenti con una lieve risposta al protocollo di superovulazione. IV109, INV118, INV117 e CTR116 hanno mostrato un "aspetto uterino puerile " e ovaie con pochi e piccoli corpi albicanti dimostrando una lieve risposta al protocollo di superovulazione.

Il numero di feti ed embrioni abortiti sono riportati in Tabella 4.13.

Gruppo	Totale numero di tessuti analizzati	Numero tessuti PCV2 positivi	Numero tessuti positivi: $\geq 10^8$ copie genoma PCV2/ml
IV	127	83	6
INV	164	153	42
CTR	73	69	17

Tabella 4.11 - Numerosità dei tessuti analizzati e di quelli PCV2 positivi in ciascun gruppo.

Diversi tessuti appartenenti a tutti e tre i gruppi sono risultati positivi mediante RT-PCR come riportato in tabella 4.14. Il numero di soggetti positivi, rispetto allo studio precedente, è stato più elevato.

In ogni caso, differenze, testate con il test Chi quadro con correzione di Yates, sono state osservate tra il gruppo IV rispetto ai gruppi INV e CTR. In particolare, IV ha mostrato un numero inferiore di campioni positivi alla PCR: 83 su 127 (IV) vs 153/164 (INV) e 69/73 (CTR). Inoltre, nel gruppo IV è stato osservato un numero inferiore di tessuti positivi contenenti valori di genoma $\geq 10^8$ copie genoma PCV2 / ml rispetto agli altri gruppi: 6/83 del gruppo IV verso 42/153 e 17/69 rispettivamente dei gruppi INV e CTR (Tabella 4.11).

Gruppo	ID animale	N° viremia	N° tamponi vaginali positivi	N° tamponi nasali positivi	N° tamponi fecali positivi	N° tessuti positivi	N° feti positivi	N° liquidi amniotici positivi
IV	108	0/8	2/9	4/9	3/9	12/20	0/3	0/3
	109	0/5	2/6	2/6	2/6	15/15	Non gravida	Non gravida
	110	1/4	0/5	2/5	1/5	15/15	Aborto PCR-	Aborto PCR-
	112	0/4	1/5	1/5	1/5	13/15	Aborto PCR	Aborto PCR
	114	0/7	0/8	3/8	2/8	23/42	0/15	0/15
	115	1/8	1/9	1/9	3/9	5/30	0/9	0/9
Totale		2/36	6/42	13/42	12/42	83/137	0/27	0/27
INV	117	3/5	5/6	5/6	6/6	15/15	Non gravida	Non gravida
	118	5/5	5/6	6/6	6/6	15/15	Non gravida	Non gravida
	119	8/8	6/9	8/9	9/9	31/32	1/10	2/10*
	123	2/7	3/8	3/8	7/8	42/46	0/16	1/16
	126	2/4	4/5	3/5	4/5	15/15	Aborto PCR	Aborto PCR
	127	1/8	2/9	4/9	6/9	36/41	0/14	0/14
Totale		21/37	25/43	29/43	38/43	153/164	1/40	3/40
CTR	116	1/5	4/6	3/6	4/6	15/15	Non gravida	Non gravida
	120	1/8	3/9	4/9	8/9	26/26	0/7	0/7
	122	6/8	8/9	9/9	9/9	28/32	1/10	0/10
Totale		8/21	15/24	16/24	20/24	69/73	1/17	0/17

Tabella 4.12 - Numero di campioni PCR PCV2+/numero di campioni analizzati presentati separatamente per tipo di campionamento e ID animale.

Anche il numero di placente PCV2+ è risultato essere meno presente nel gruppo IV (11/28 pari al 39%) rispetto ai gruppi INV (31/40 pari al 77%) e CTR (13/17 pari al 76%).

Inoltre, solo 2 feti (uno del gruppo INV e l'altro del gruppo CTR) e 3 liquidi amniotici (tutti del gruppo INV) sono stati trovati positivi al PCV2.

	Gruppo														
	IV						INV						CTR		
ID scrofe	108	114	115	109	110	112	119	123	127	117	118	126	120	122	116
Numero di feti	3	15	9	0	3 ABT	3 ABT	10	16	14	0	0	2 ABT	7	10	0

Tabella 4.13 - Feti ed embrioni abortiti (ABT).

Tutti i risultati alla RT-PCR riguardanti i tessuti materni, i feti e i liquidi amniotici sono sintetizzati nella tabella 4.14.

ID scrofa	GRUPPO														
	IV						INV						CTR		
	Scrofe gravide			Scrofe non gravide			Scrofe gravide			Scrofe non gravide			Scrofe gravide		Scrofe non gravide
Numero di feti	108	114	115	109	110	112	119	123	127	117	118	126	120	122	116
	3	15	9	0	0	0	10	16	14	0	0	0	7	10	0
Tonsilla sinistra	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tonsilla destra	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linfonodo uterino sinistro	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linfonodo uterino destro	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linfonodo inguinale sinistro	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linfonodo inguinale destro	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ovaio sinistro	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ovaio destro	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salpinge sinistra	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salpinge destra	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vagina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cervice	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Feti (pos/tot.)	-	-	-	/	/	/	1/10	-	-	/	/	/	-	1/10	/
Liquido amniotico (pos/tot.)	-	-	-	/	/	/	2/10	1/16	-	/	/	/	-	-	/
Placenta (pos/tot.)	2/3	8/15	1/9	/	/	/	9/10	14/16	8/14	/	/	/	7/7	6/10	/
Tratto uterino sinistro*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tratto uterino destro*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabella 4.14 - Distribuzione dei tessuti positivi (+) per PCV2 con la RT-PCR. Note: * Negli animali gravidi tutti i tratti uterini corrispondenti ad ogni feto sono stati valutati con PCR; l'utero di scrofe non gravide è stato campionato in tre differenti punti per ogni corno.

4.3.3.2 Lesioni microscopiche

Lesioni istopatologiche caratteristiche di PCVDs non sono state rilevate.

Nei tessuti linfoidi erano presenti lieve iperplasia istiocitaria della midollare e normoplasia a livello follicolare, tipiche di uno stato di quiescenza.

In due animali (uno del gruppo IV e l'altro del gruppo CTR) è stata rilevata una polmonite interstiziale linfoplasmacellulare cronica estesa moderata associata a una moderata iperplasia del BALT.

In sette animali (3 del gruppo IV, 2 del gruppo INV e 2 del gruppo CTR) sono stati osservati ascessi focali o multifocali, monolaterali o bilaterali, cronici moderati a carico delle cripte tonsillari.

I tessuti con un titolo di DNA virale superiore a 10^8 copie genomiche/g sono stati sottoposti a un esame IHC. Sebbene in generale la carica virale è risultata più alta nel gruppo INV, la positività IHC è stata dimostrata nei tessuti di solo 2 animali del gruppo INV. Rari follicoli linfoidi hanno mostrato una localizzazione citoplasmatica del virus nelle cellule follicolari dendritiche o occasionalmente nel citoplasma degli istiociti nelle tonsille e nel linfonodo inguinale superficiale (Foto 4.5 e Tabella 4.15).

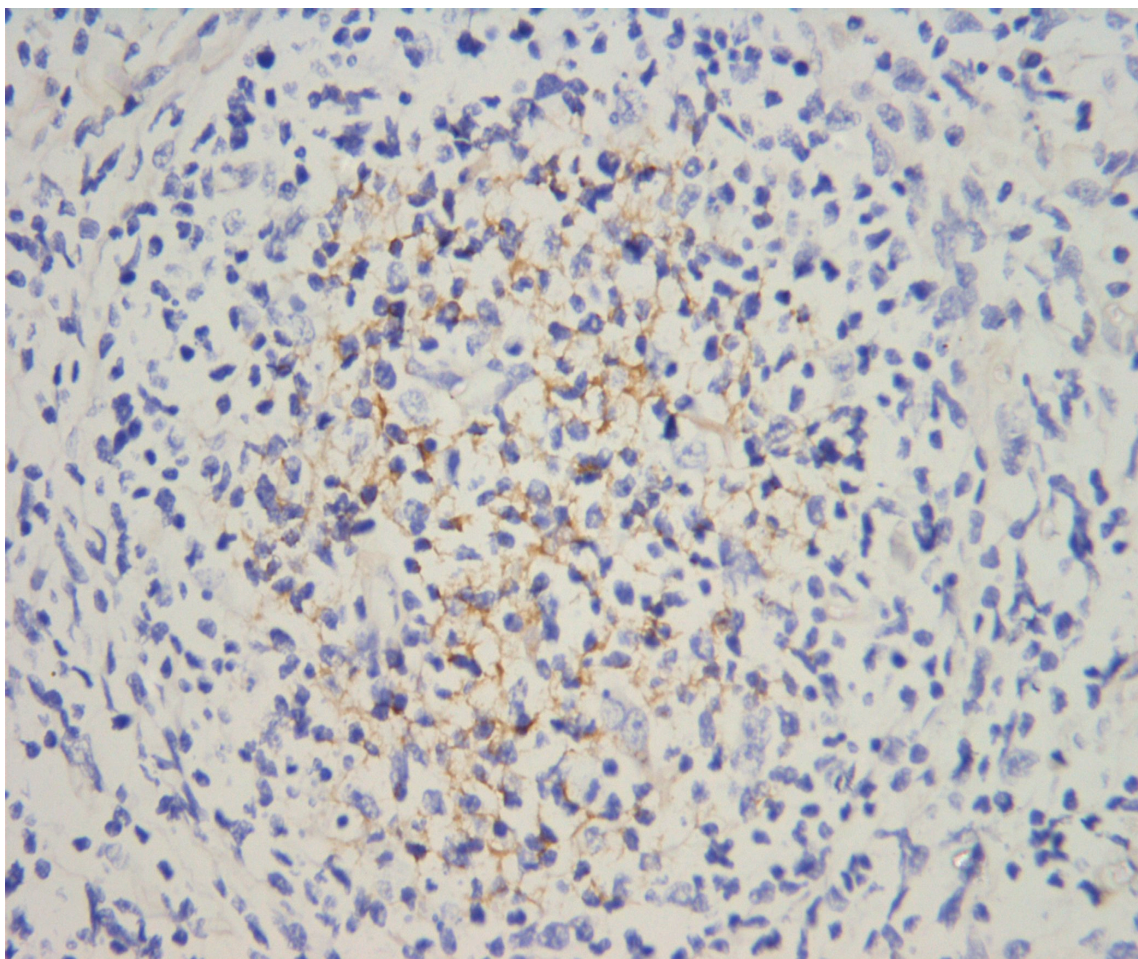


Foto 4.5 - Suino, tonsilla. Positiv  immunostochimica per PCV2 in cellule follicolari dendritiche di un follicolo linfatico. (Immunostochimica. Ob. 20X).

Gruppo	ID animale	Tessuto	Localizzazione dell'antigene PCV2
INV	117	Tonsilla sinistra	Cellule follicolari dendritiche, istiociti occasionali
	117	Tonsilla destra	Cellule follicolari dendritiche, istiociti occasionali
	118	Tonsilla sinistra	Cellule follicolari dendritiche, istiociti occasionali
	118	Tonsilla destra	Cellule follicolari dendritiche, istiociti occasionali
	118	Linfonodo inguinale superficiale sinistro	Rari istiociti
	118	Linfonodo inguinale superficiale destro	Rari istiociti

Tabella 4.15 - Localizzazione istologica del PCV2 con metodica immunostochimica.

4.4 DISCUSSIONE

Non sono molti in letteratura gli studi che riportano la frequenza e l'entità della quantificazione del PCV2, in assenza di PCVD, in suini convenzionali (Madson e Opriessnig, 2011; Sarli *et al.*, 2010). Essi comunque rappresentano la dimostrazione di un dato epidemiologico noto circa il PCV2, l'infezione è alimentata dalla continua circolazione del virus tra gli animali dell'allevamento. Quest'ultima, a sua volta, è alimentata dalla presenza nelle popolazioni di suino di soggetti in cui il virus può replicare, diffondersi nell'organismo ed essere emesso a livelli più elevati che in altri soggetti. Questi "amplificatori" del virus sono in genere animali con basso titolo anticorpale verso PCV2, in cui il virus più facilmente può raggiungere i tessuti bersaglio (in genere il tessuto linfoide), replicarsi e produrre più episodi di viremia a cui segue lo shedding per diverse vie e ad elevato titolo virale.

Il risultato della presente prova sperimentale, valutando le frequenze della viremia e dello shedding virale nel gruppo dei soggetti di controllo, riflette quanto sopra affermato. Gli animali provenivano da un allevamento positivo per PCV2, in cui era atteso il riscontro del virus e, dai risultati del prelievo al giorno -2, un soggetto era viremico. La continua esposizione al virus in condizioni di infezione spontanea innesca un certo grado di protezione visto che, l'infezione sperimentale del gruppo INV non ha generato, nel confronto con il gruppo CTR, un significativo aumento degli episodi di viremia o di shedding virale.

Il presente studio ha confermato la possibilità di trasmissione a scrofe convenzionali dell'infezione da PCV2 mediante l'impiego di seme infetto. Infatti, la presenza di una maggiore quantità di tessuti materni, dei soggetti appartenenti al gruppo INV, positivi alla PCR rispetto ai soggetti del gruppo I dell'esperimento precedente (vedi capitolo 3) ha dimostrato, in maniera ancora più evidente, la riproducibilità sperimentale dell'infezione.

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 gruppo IV ha mostrato, una più bassa quantità di campioni di siero PCR+ e, al contrario di quanto avvenuto per il gruppo INV, l'assenza di feti e liquidi amniotici positivi al PCV2 dimostrando che la vaccinazione ha giocato un ruolo fondamentale nella protezione delle scrofe prima e dei feti in una fase successiva.

Inoltre, nel corso della sperimentazione, il gruppo IV non solo ha mostrato, una più bassa quantità di campioni PCR+ sia nei tamponi sia nei tessuti ma anche una percentuale di tessuti positivi, contenenti valori di genoma $\geq 10^8$ copie di DNA di PCV2 / ml, più bassa rispetto agli altri due gruppi. Ciò ha contribuito a rafforzare la tesi sul ruolo attivo del vaccino nel ridurre sia l'eliminazione del virus sia il carico virale tissutale.

Appare contrastante il risultato dell'andamento anticorpale nei 3 gruppi in cui i soggetti CTR e INV hanno fatto registrare titoli anticorpali maggiori rispetto al gruppo IV. Tale dato riflette la non completezza, nella valutazione dell'effetto del vaccino, nell'affidarsi alla sola determinazione del titolo anticorpale allorché, come accade in malattie da virus, anche la risposta cellulare mediata e l'immunità di mucosa rappresentano meccanismi effettori importanti ai fini protettivi. Paradossalmente nel gruppo IV il basso titolo anticorpale registrato è da associare a bassa frequenza della viremia e dello shedding virale, che possono essere spiegati solo dalla implementazione dell'immunità di mucosa che riduce la possibilità di infezioni produttive.

Nella riproduzione dell'infezione, confermato anche dalle positività in PCR e in immunocistochimica, il virus è stato ampiamente riscontrato negli organi bersaglio rappresentati dal tessuto linfoide che, all'indagine immunocistochimica sono risultati positivi solo in 2 soggetti del gruppo INV, a sottolineare l'alta carica virale presente nei tessuti di animali di questo gruppo.

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 in questo ultimo esperimento.

In questo studio è stato inoltre possibile rinvenire una **positività di placenta**: condizione questa che si è manifestata in maniera più evidente nei soggetti infetti rispetto a quelli vaccinati.

Infine, l'evidenziazione con l'immunoistochimica di pochi campioni su molti positivi alla PCR associato al già dimostrato limite di sensibilità dell'IHC (carica virale maggiore di 10^8 copie di genoma PCV2/500ng DNA) descritto da Brunborg *et al.* (2004), dimostra i limiti di questa metodica di indagine in un contesto di malattia caratterizzato da basso numero di copie virali. A tale proposito, invece, l'utilizzo della RT-PCR come tecnica di quantificazione della presenza del virus nei tessuti si è dimostrata, secondo quanto affermava anche Hansen (2010), ancora una volta molto sensibile oltre che attendibile.

L'ultimo degli aspetti che lo studio si prefiggeva era l'indagine sulla esposizione dei feti. Un episodio viremico nella scrofa rappresenta la causa più frequente di esposizione dei feti che nel nostro studio è dimostrato da una più bassa percentuale di placenti positive al PCV2 nel gruppo IV (40 %) rispetto a quello INV (77 %) e CTR (76 %), dal fatto che i 2 feti positivi per PCV2 erano (1 per gruppo) in INV e CTR e che su 3 liquidi amniotici positivi tutti sono stati riscontrati nel gruppo INV. La vaccinazione ha quindi dimostrato un effetto protettivo sull'infezione dei feti o degli invogli, mentre nessuna conclusione sull'effetto del PCV2 sulla percentuale di non gravidanza o di aborto può essere desunto dai dati in nostro possesso. I 3 soggetti che hanno abortito avevano un numero di corpi lutei troppo basso per garantire il mantenimento della gravidanza, che dovrebbe essere 4-5, quindi in essi si può semplicemente ipotizzare una scarsa risposta alla superovulazione; mentre i soggetti rivelatisi non gravidi hanno mostrato durante la necropsia un utero puerile indicativo di immaturità, quindi di animale non ancora recettivo al trattamento di sincronizzazione-superovulazione.

4.5 CONCLUSIONI

Rispetto al precedente esperimento (capitolo 3) lo studio ha permesso di confermare che l'esposizione intrauterina di seme infetto con PCV2 in scrofe convenzionali può riprodurre l'infezione però, dagli ulteriori dati ottenuti in questo esperimento l'infezione da PCV2 contestualmente alla fecondazione, non sembra essere la causa di ridotta probabilità di gravidanza.

Lo studio ha permesso di dimostrare che:

1. la vaccinazione ha giocato un ruolo importante nel ridurre in maniera evidente, ma non nell'eliminare completamente, la disseminazione nell'organismo e la eliminazione verso l'esterno del PCV2. Nei 3 gruppi, sia dalla quantificazione del virus nei tamponi e nel sangue (parte *in vivo*) che nei tessuti (parte *post-mortem*), è emersa una differenza di frequenza di positività (ma non di titolo virale) nel confronto tra il gruppo vaccinato (che ha mostrato una bassa frequenza di eventi viremici, di emissione virale per le vie naturali e della presenza di tessuti infetti all'esame *post-mortem*) e gli altri due (gruppo non vaccinato e controlli).
2. emerge un ruolo protettivo della vaccinazione verso i feti stante:
 - la minore percentuale di placenti positive nel gruppo IV rispetto a quelli CTR e INV;
 - la positività di feti/liquidi amniotici solo nei gruppi INV e CTR.

Produzione scientifica personale

- Giuseppe Sarli, Federico Morandi, Serena Panarese, Fabio Ostanello, Carlo Bianco, **Domenico Ferrara**, Giovanna Galeati, Maria Laura Bacci, Michele Dottori, Paolo Bonilauri, Davide Lelli, Giorgio Leotti, Thais Vila, Joisel Francois (2012): “PCV2 shedding after challenge by infected semen in PCV2 vaccinated and non-vaccinated conventional gilts” Proceeding of the 43th American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting.

Bibliografia

- 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 IM, Moldal T, Jonassen CM. (2004) “Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with weaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR.” J. Virol. Methods, 122(2):171-8.
- 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.

- Cordioli, P., Sala, G., Brocchi, E., Gamba, 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.
- Ha Y, Lee YH, Ahn KK, Kim B, Chae C (2008) "Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation." *Vet Pathol.* 45(6):842-8.
- Hafez ESE, Hafez B. (2000) "Reproductive cycles" in "Reproduction in farm animals-7th Edition" di Hafez ESE, Hafez B ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hansen M.S., Hjulsgaard C.K., Bille-Hansen V., Haugegaard S., Dupont K., Høgedal P., Kunstmann L., Larsen L.E. (2010) "Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures". *Vet Microbiol.* 144: 203-209.
- Hesse R, Kerrigan M, Rowland RR. (2008): Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res*, 132(1-2):201-7.
- Katz J.B., Pedersen 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 polymorphisms. *Biologicals* 20,187-195.
- 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.

- Madson DM and Opriessnig T. (2011). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Anim Health Res Rev.* 12 (1): 47-65.
- 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, 75-80.
- Opriessnig T., Thacker E..L, Yu S., Fenaux M., Meng X.J., Halbur P.G. (2004) “Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2.” *Vet Pathol.* 41 (6): 624-640.
- Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG (2007) “Porcine circovirus type 2 associated diseases: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies.” *J. Vet. Diagn. Invest.* 19:591-615.
- 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. 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. In: *Proceeding of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy*, pp. 253–254.
- Rosell C., Segales J., Plana-Duran J., Balasch M., Rodríguez-Arrijoja G.M., Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S., Domingo M. (1999) “Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural

- cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs.” *J Comp Pathol.* 120: 59–78.
- Sanchez R.E., Meerts P., Nauwynck H.J., Penseart M.B. (2003). Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early post-natal life. *Vet. Microbiol* 95, 15-25.
 - 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 infettato con circovirus suino tipo2 (PCV2)”. XXXVI Congresso SIPAS (Societa’ Italiana Patologia e Allevamento Suini), 25-26 Marzo, Montichiari, Brescia (Italia). pp. 254-263.
 - Sarli G, Ostanello F, Morandi F, Fusaro L, Gnudi M, Bacci B, Nigrelli A, Alberali 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.
 - Shen H, Wang C, Madson DM, Opriessnig T. (2010) “High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America”. *Prev. Vet. Med.* 97(3-4):228-36.
 - Tamanini C., Bono G., Cairoli F., Chiesa F. (1985). Endocrine responses induced in anestrus goats by the administration of different hormones after fluoregestone acetate treatment. *Anim. Reprod. Sci.* 9, 357-364.