



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICO
VETERINARIE**

CICLO XXVII

**VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA
VERSO LA VACCINAZIONE PER PCV2
NEL MAIALE**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Franco Brindani

Tutor:
Chiar.mo Prof. Paolo Martelli

Candidato:
Dott. Michele Benetti

INDICE

ABSTRACT

INTRODUZIONE

1 - CIRCOVIRUS SUINO

- 1.1 Introduzione
- 1.2 Eziologia
- 1.3 Epidemiologia
- 1.4 Patogenesi ed immunità
- 1.5 Modelli di riproduzione della PCV-SD
- 1.6 Sintomatologia e lesioni
- 1.7 Diagnosi
- 1.8 Prevenzione e Controllo

2 - PARTE SPERIMENTALE

- 2.1 Materiali e metodi
- 2.2 Risultati
- 2.3 Discussione

3 - CONCLUSIONI

4 - BIBLIOGRAFIA

ABSTRACT

Lo studio si propone di valutare la protezione clinica, la viremia e la risposta immunitaria (umorale e cellulare) in corso di vaccinazione verso PCV-2 in suinetti provenienti da scrofe vaccinate e a loro volta vaccinati ad età diverse, 4, 6 e 8 settimane di vita.

Lo studio è stato condotto su tre cicli produttivi successivi (repliche). Inizialmente sono state selezionate 46 scrofette vaccinate alla prima inseminazione. Dopo il primo, secondo e terzo parto, sono state nuovamente vaccinate all'inseminazione e sottoposte a prelievi ematici. I suinetti corrispondenti ad ogni parto (primo, secondo e terzo) sono stati suddivisi in modo casuale in 3 gruppi (100 animali/gruppo) in base alla tempistica prevista per la vaccinazione: 4, 6 e 8 settimane di età. Un quarto gruppo è stato inserito nella prova come controllo non vaccinato. I suinetti sono stati vaccinati per via intramuscolare con una dose (2 ml) di un vaccino commerciale a subunità contenente la proteina capsidica (Cap) di PCV-2 (Porcilis[®] PCV). Su venti animali per gruppo sono stati eseguiti prelievi ematici ogni 4 settimane dallo svezzamento alla macellazione allo scopo di valutare la eventuale viremia verso PRRS e PCV-2, la immunità umorale e cellulo-mediata. Sono stati registrati i segni clinici ed i trattamenti individuali (morbilità), la mortalità e il peso corporeo. Nella prima e seconda replica, non sono stati rilevati segni di PCVD. Tutti i protocolli di vaccinazione (4, 6 e 8 settimane di età) sono stati in grado di indurre titoli anticorpali e immunità cellulo-mediata. Nella terza replica, l'infezione naturale si è verificata a 16 settimane ed il 100% dei suini controllo ha mostrato una carica virale nel sangue anche superiore a 10^6 copie di DNA di PCV2 per ml in associazione a segni clinici di PCVD. Tutti gli animali vaccinati sono stati invece protetti e solo pochi sono risultati viremici. La protezione clinica migliore, sostenuta da una più robusta risposta immunitaria è stata osservata nei suini vaccinati a 6 settimane di età.

Nel complesso, ripetute vaccinazioni verso PCV-2 nelle scrofe in riproduzione e i successivi livelli anticorpali materni elevati che ne conseguono, non hanno interferito in modo significativo con l'induzione dell'immunità sia umorale che cellulo-mediata nei loro suinetti dopo la vaccinazione. Inoltre, lo studio dimostra che l'efficacia della vaccinazione nei suinetti viene conservata anche con la somministrazione del vaccino successivamente alle 3-4 settimane di età, e che, in particolare, la vaccinazione a 6 settimane di età potrebbe essere applicata con benefici clinici anche per soddisfare le pratiche di gestione.

Summary

The study aims at evaluating the clinical protection, the level of PCV2 viremia and the immune response [antibodies and IFN- γ secreting cells (SC)] in piglets derived from vaccinated sows and vaccinated at different age, namely 4, 6 and 8 weeks. The study has been carried out over three subsequent production cycles (replicates). At the start/enrolment, 46 gilts were considered at first mating, bled and vaccinated. At the first, second and third farrowing, dams were bled and re-vaccinated at the subsequent mating after weaning piglets. The matching piglets at each farrowing (first, second and third) were randomly allocated in 3 different groups (100 animals/group) based on the timing of vaccination (4, 6 and 8 weeks of age). One group was kept non-vaccinated (controls). Piglets were vaccinated intramuscularly with one dose (2 mL) of a commercial PCV2a-based subunit vaccine (Porcilis[®] PCV). Twenty animals per group were bled four weeks apart from vaccination to slaughterhouse for the detection of PCV2 and PRRSV viremia, humoral and cell-mediated immune responses. Clinical signs and individual treatments (morbidity), mortality, and body weight were recorded. In the first and second replicate, a weak PCV2 natural challenge, which did not result in PCVD, occurred at 17-20 weeks of age. All vaccination schemes (4, 6 and 8 weeks of age) were able to induce antibody titres and IFN- γ SC. In the third replicate, PCV2 natural infection occurred at 16 weeks and 100% of the control pigs showed a viral burden in the blood even higher than 10^6 DNA copies/mL in association with clinical signs referred to as PCVD. All vaccinated animals were protected and only a few resulted viremic. The highest clinical protection sustained by immune reactivity was observed in pigs vaccinated at 6 weeks of age. Overall, repeated PCV2 vaccination in sows at mating and the subsequent higher levels of maternally derived antibodies did not significantly interfere with the induction of both humoral and cell-mediated immunity in their piglets after vaccination. In addition, the study demonstrates that the efficacy of vaccination in piglets is conserved also when the vaccine is injected later than 3-4 weeks of age, and that, in particular, vaccination at 6 weeks of age could be recommended or applied when required to meet the management practices.

INTRODUZIONE

Il controllo delle PCVD si basa su strategie di gestione, controllo delle co-infezioni, e vaccinazione. Allo stato attuale, i vaccini commerciali per PCV-2 sono disponibili per l'uso in suinetti da 3 settimane di età e tutti sono stati descritti come efficaci nel controllo della malattia (Fachinger et al., 2008; Fort et al., 2008; Martelli et al., 2011; Fraile et al., 2012; Seo et al., 2012). I vaccini per PCV-2 sono in grado di ridurre la viremia e le lesioni linfoidi ma la potenziale interferenza dell'immunità materna e l'ottimizzazione dei protocolli di vaccinazione in relazione alla reattività del sistema immunitario dei suinetti sono argomenti attuali di ricerca. Diversi studi hanno dimostrato che la vaccinazione contro PCV-2 nei suinetti con alti livelli di anticorpi di origine materna (MDA) conferisce protezione clinica (Fachinger et al., 2008; Kixmoller et al., 2008; Opriessnig et al., 2008a; Martelli et al., 2011; Fraile et al., 2012). Tuttavia, in alcuni di questi studi, si è osservato che l'immunità materna interferisce con la risposta immunitaria umorale dopo vaccinazione (Opriessnig et al., 2008a; Fraile et al., 2012). La maggior parte degli studi pubblicati ha dimostrato sierconversione sia nei suini colpiti da PCV2-SD che in suini con forma subclinica PCV-SI (Rodríguez-Arrioja et al., 2000; Sibila et al., 2004; Grau-Roma et al., 2009). Dati di laboratorio hanno dimostrato inoltre che l'immunità cellulo-mediata può giocare un ruolo importante nella eliminazione (clearance) virale in combinazione con gli anticorpi neutralizzanti e che la sua intensità può essere influenzata dalla portata della replicazione virale (Meerts et al., 2006; Fort et al., 2009a, 2009b; Oh et al., 2012). Queste caratteristiche sono state studiate in condizioni di campo, sia in suini naturalmente infetti e presentanti sintomatologia che in animali vaccinati privi di segni clinici (Steiner et al., 2009; Opriessnig et al., 2011; Martelli et al., 2013; Ferrari et al., 2014). Studi precedenti hanno dimostrato che alti livelli di anticorpi materni nei suinetti non consentono un'elevata sierconversione dopo la vaccinazione. Viceversa, quando i livelli di anticorpi acquisiti passivamente sono inferiori ad un certo titolo (variabile a seconda del metodo sierologico), la somministrazione del vaccino induce una marcata sierconversione (Fort et al., 2009b; Martelli et al., 2011, 2013; Fraile et al., 2012). Solitamente, nei suinetti vaccinati, a fronte di un elevato livello di immunità passiva, si ha una diminuzione dei livelli anticorpali simile a quella di suini non vaccinati anche se nei primi il calo è meno evidente. Inoltre, Haake e coll. (2014) hanno suggerito che la vaccinazione ad 1 settimana di età influisce chiaramente all'induzione di un'immunità umorale attiva nei suinetti. Viceversa, la risposta immunitaria cellulo-mediata non è influenzata da livelli di anticorpi materni e contribuisce ad una protezione duratura (Fort et al., 2009a, 2009b; Martelli et al., 2011; Ferrari et al., 2014). Il presente studio è stato messo in atto per valutare l'efficacia di un vaccino per PCV-2

somministrato in singola dose a 4, 6 o 8 settimane di età, su morbidità, mortalità, IPG, e viremia in suini derivati da scrofette e scrofe ripetutamente vaccinate in concomitanza della inseminazione. La vaccinazione delle scrofette e delle scrofe nella sperimentazione non ha avuto lo scopo di valutare l'effetto del vaccino sulle prestazioni riproduttive, ma solo di aumentare e omogeneizzare l'immunità tra le riproduttrici stesse e il conseguente passaggio di immunità passiva ai neonati. L'immunogenicità del vaccino nei suinetti delle tre successive repliche è stata valutata in termini di risposta anticorpale e cellulare (cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche).

1 - CIRCOVIRUS SUINO

1.1 INTRODUZIONE

A partire dalla fine degli anni '90 in Europa ed in Nord America è stato identificato un agente apparentemente nuovo simile al circovirus suino (porcine circovirus, PCV) in suini che presentavano una condizione patologica caratterizzata da deperimento, distress respiratorio ed aumentata mortalità (Allan et al., 1998) .

Questo virus era differente dal già noto PCV contaminante le colture di cellule renali di suino (PK-15). È stato quindi proposto di nominare il PCV già noto e non patogeno per il suino, come circovirus suino di tipo 1 (PCV1), ed il nuovo virus associato a malattia, come circovirus suino di tipo 2 (PCV2) (Allan et al., 1999).

PCV2 è oggi considerato uno dei patogeni più importanti nei suini domestici in tutto il mondo, poiché è responsabile di notevoli perdite economiche per il settore dell'allevamento suinicolo. Il virus è stato associato ad una serie di malattie che vengono denominate con il nome di “malattie da circovirus suino” (porcine circovirus associated diseases, PCVDs) (Allan et al., 2002).

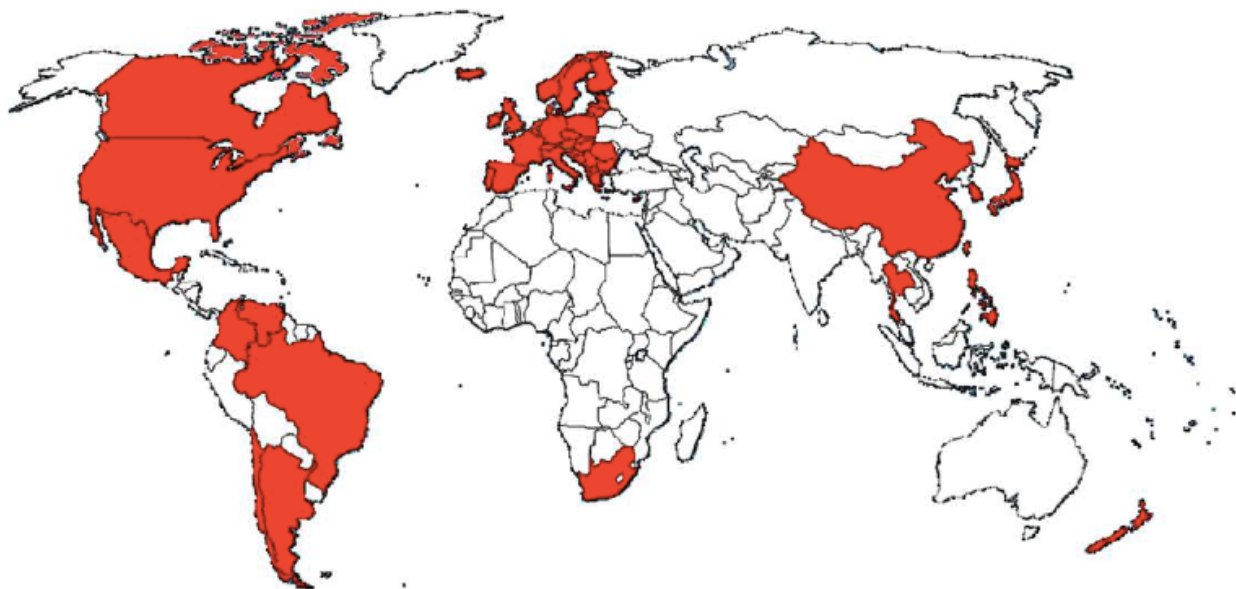


Figura 1 Stati in cui sono stati descritti casi di PCVD. Grau-Roma 2011

La condizione patologica più importante causata dal virus è la malattia sistemica da PCV2 (PCV2-systemic disease, PCV2-SD, precedentemente nota come *postweaning multisystemic wasting syndrome*, PMWS) (Clark, 1996; Herding, 1996), ma sono da considerarsi significative anche la forma riproduttiva (PCV2-reproductive disease, PCV2-RD) (West et al., 1999) e la sindrome

dermatite-nefrite del suino (porcine dermatitis-nephritis syndrome, PDNS) (Rossel et al., 2000). Nonostante in letteratura siano descritte anche una forma polmonare (PCV2-lung disease, PCV2-LD) (Drolet et al., 2003), ed una forma enterica (PCV2-enteric disease, PCV2-ED) (Harding, 2004) la loro differenziazione rispetto alla PCV2-SD non è chiara ed è presente una sovrapposizione diagnostica tra la malattia sistemica e queste due forme patologiche. Infine, anche se rimasta sconosciuta per moltissimo tempo, la forma più comune dell'infezione da PCV2 è la subclinica (PCV2-subclinical infection, PCV2-SI) (Segalés et al., 2005). Sebbene in corso di PCV2-SI non si osservi una sintomatologia clinica manifesta, prove di campo indicano che la vaccinazione per PCV2 è in grado di migliorare i parametri produttivi (incremento ponderale giornaliero, percentuale di scarti, body condition score e peso della carcassa) in corso di PCV2-SI.

La percezione delle PCVDs e della sua correlazione eziologica a malattia è radicalmente cambiata negli ultimi 15 anni. Nelle prime descrizioni della PCV2-SD le gravi lesioni linfoidi sono state associate alla presenza del virus (Harding, 2004). Tuttavia, il carattere ubiquitario di PCV2, gli studi retrospettivi che datavano questa infezione virale come già presente negli anni '60, l'eziopatogenesi multifattoriale della PCV2-SD e la mancanza di una coerente soddisfazione dei postulati di Koch utilizzando il "nuovo" virus in un modello suino, hanno generato grandi controversie sulla causalità di PCV2 nella malattia. In realtà, e soprattutto prima dell'avvento dei vaccini per PCV2, molti veterinari e scienziati ritenevano che l'introduzione e la successiva diffusione della PCV2-SD non fossero associate a PCV2, ma ad un altro agente non meglio identificato, a volte indicato in letteratura come "agente X".

A partire dal 2004 sono stati registrati vari vaccini commerciali per PCV2 utilizzati in suinetti e scrofe che hanno contribuito a diminuire notevolmente le perdite economiche attribuite a PCV2-SD e PCV2-SI. In appena 7 anni (2007-2013), i vaccini per PCV2 sono diventati i più utilizzati nei suini di tutto il mondo (Segalés et al., 2005).

I PCV non sono considerati un problema di sanità pubblica. Tuttavia, il recente rilevamento di DNA di PCV in due vaccini per rotavirus umani utilizzati nei bambini, ha creato allarmismo in tutto il mondo. In realtà questi dati riflettono principalmente un problema sul controllo della qualità nella produzione di vaccini per uso umano, soprattutto se nel processo di produzione rientrano prodotti di origine suina. Tale constatazione mette in evidenza la necessità di monitorare, ed eventualmente eliminare, la presenza di frammenti di DNA virale estranei nei medicinali, siccome già in precedenza erano stati riportati problemi di contaminazione da DNA di PCV1 in alcuni vaccini per il suino.

1.2 EZIOLOGIA

Entrambi i PCVs appartengono alla famiglia *Circoviridae*, genere *Circovirus*. Sono tra i più piccoli virus noti, con un diametro di 12-23 nm e sono privi di envelope. Il nucleocapside di PCV2 presenta una simmetria icosaedrica e studi tridimensionali ne mostrano un profilo poligonale, contenente 60 elementi proteici costituenti il capsido (Cap), disposti in 12 unità pentameriche leggermente sporgenti, per un diametro complessivo di circa 20,5 nm.

Il genoma è rappresentato da un singolo filamento di DNA (ssDNA) circolare, contenente 1759 e 1967-8 nucleotidi per PCV1 e PCV2, rispettivamente (Hamel et al., 1998). Quando i PCVs infettano una cellula, il ssDNA viene convertito in DNA intermedio a doppio filamento (dsDNA), detto anche forma replicativa (replicative form, RF). La RF è bi-senso, con geni codificanti sia il filamento virale (negativo) sia il complementare (positivo). I geni di PCV2 sono disposti in 11 open reading frame (ORFs) putative, tuttavia, l'espressione proteica è stata descritta solo per tre ORF. ORF1 (gene Rep) si trova sul filamento positivo ed è orientata in senso orario e codifica per le replicasi non-strutturali Rep e Rep', di 314 e 178 aminoacidi (aa) di lunghezza, rispettivamente (Cheung, 2003). ORF2 (gene Cap) è posta sul filamento complementare, è orientata in senso antiorario e codifica per la sola proteina strutturale del capsido (Cap) di 233-234 aa (Nawagitgul et al., 2000). ORF3 è completamente sovrapposta al gene ORF1, è situata nella catena complementare ed orientata in senso antiorario. Codifica per una proteina non strutturale di 105 aa di lunghezza. *In vitro*, la proteina ORF3 è risultata coinvolta nell'apoptosi indotta dal virus in cellule PK-15 (Liu et al., 2005). Recentemente, è stato anche riportato che in suinetti infettati con un PCV2 mutante, delevato della ORF3, si è osservata una diminuita virulenza rispetto a suini infettati con il ceppo di PCV2 originario (Segalés et al., 2005).

Le prime analisi di sequenza dei diversi ceppi di PCV2 da tutto il mondo hanno indicato una stretta correlazione filogenetica, con un'identità nucleotidica superiore al 93%. Le sequenze con un cut-off di diversità nucleotidica del 3,5%, sono state suddivise in due gruppi principali, definiti genotipo a e genotipo b. In uno studio retrospettivo su ceppi Danesi del 1980 è stato individuato un terzo genotipo (PCV2c) mentre un ulteriore studio, limitato agli isolati cinesi, ha proposto un quarto genotipo, nominato PCV2d, che ad oggi non è mai stato descritto al di fuori della Cina. Infine, dati preliminari suggeriscono che esisterebbe un quinto genotipo in ceppi provenienti da cinghiali di Europa e Sud America (Segalés et al., 2005).

L'origine evolutiva di PCV1 e PCV2 sembra essere comune ma non è stato trovato un potenziale antenato per entrambi i virus. Per quanto riguarda i diversi genotipi di PCV2, all'interno del genotipo PCV2a è stata descritta una certa variabilità di sequenza, suggerendo che questo genotipo possa essere antecedente al genotipo PCV2b. Questo risultato concorda anche con osservazioni

epidemiologiche che indicano PCV2b come il genotipo attualmente predominante, a differenza del PCV2a che era il genotipo prevalente dal 1996 fino agli inizi del 2000. È stato suggerito che l'emergenza di PCV2b nei suini in Nord America ed in Europa sia stata concomitante ad una più grave espressione della malattia clinica. Tuttavia, uno studio recente ha ipotizzato che entrambi i genotipi siano originati da un antenato comune circa 100 anni fa e che, da quel momento, abbiano seguito traiettorie evolutive indipendenti, nonostante la co-circolazione nelle stesse specie ospiti e regioni geografiche.

Cepi differenti di PCV2 dello stesso o di diverso genotipo possono essere rilevati contemporaneamente nello stesso animale (Segalés et al., 2005). Recentemente, studi *in vivo* ed *in vitro* hanno fornito prove di una potenziale ricombinazione virale. È stato suggerito che l'emergere di nuovi genotipi potesse essere il risultato di una ricombinazione tra ceppi coesistenti nello stesso animale. Infatti, in Quebec (Canada) è stato rilevato un virus ricombinante, contenente la ORF1 di PCV1 e la ORF2 di PCV2a, anche se la sua origine esatta è in discussione, data la sua somiglianza con un ceppo presente in un vaccino chimerico inattivato.

Sulla base dell'analogia reattività di anticorpi monoclonali e policlonali verso diversi ceppi di PCV2, si era inizialmente pensato che non esistessero particolari differenze antigeniche tra ceppi di PCV2. Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato l'esistenza di una certa variabilità antigenica tra genotipi di PCV2, mediante l'analisi in immunoperossidasi su monostrato cellulare (immunoperoxidase monolayer assay, IPMA) e saggi di neutralizzazione virale con anticorpi monoclonali. Nonostante l'esistenza di differenze antigeniche, l'immunità indotta dopo aver infettato i suini con un genotipo è risultata protettiva per l'infezione sperimentale con l'altro genotipo. Tale cross-reattività antigenica è stata confermata anche dall'efficacia dei vaccini attuali, che si basano prevalentemente su ceppi di PCV2a.

Riguardo le caratteristiche biologiche e chimico-fisiche dei PCVs, è noto che PCV1 ha una densità di galleggiamento di 1,37 g/ml in CsCl, non è in grado di emoagglutinare gli eritrociti di varie specie, è resistente all'inattivazione a pH 3 e da cloroformio, ed è stabile a 70 °C per 15 minuti. L'infettività di PCV2 diminuisce molto in un tampone acido, ma il virus può mantenersi in vita anche a pH inferiori a 2; l'infettività è marcatamente ridotta ad un pH di 11-12. La sopravvivenza di PCV2 è stata dimostrata a temperature elevate (56 °C per 1 ora e 75 °C per 15 minuti), indicando che il virus potrebbe sopravvivere in aree contaminate durante la stagione calda. L'esposizione sperimentale di PCV2 per tempi diversi (da 10 minuti a 24 ore) a temperatura ambiente, ad una serie di disinfettanti commerciali a base di clorexidina, formaldeide, iodio, agenti ossidanti e alcoli ha indotto una riduzione significativa del titolo virale (Segalés et al., 2005).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

PCV2 è considerato ubiquitario (Allan e Ellis, 2000) ed i suini domestici e selvatici sembrano essere gli ospiti naturali (Segalés e Domingo, 2002). Il DNA di ceppi di PCV2 ottenuti da cinghiali è stato sequenziato, mostrando una identità nucleotidica con PCV2 isolati da suini domestici (per entrambi i genotipi PCV2a e PCV2b). Anche PCV1 è considerato ubiquitario nella popolazione suina, nonostante la sua prevalenza sia inferiore a quella di PCV2 (Calsamiglia et al., 2002). Anche PCV1 è stato rilevato nel cinghiale e le sequenze ottenute si raggruppano con quelle dei PCV1 da suini domestici.

PCV2a e PCV2b sono i genotipi più diffusi e PCV2b è il genotipo che ha oggi la prevalenza più elevata. Mediante analisi di sequenza (GenBank), PCV2a è risultato essere il genotipo più frequente nei suini colpiti da PCVAD fino al 2003, mentre PCV2b è il genotipo più segnalato successivamente. Studi pubblicati in diversi paesi come Canada, Danimarca, Spagna, Svezia, Svizzera e Stati Uniti, hanno descritto un cambiamento nella prevalenza dal genotipo PCV2a al genotipo PCV2b in concomitanza col verificarsi di gravi epidemie di PCV2-SD. Sebbene tali dati epidemiologici non dimostrino che la comparsa di epidemie sia causata da ceppi di PCV2b, tale coincidenza temporale e spaziale fa ipotizzare che lo shift della prevalenza di genotipo faccia parte del puzzle evolutivo delle PCVDs. In realtà, non vi è ancora una risposta chiara sul perché PCV2, un virus piuttosto datato, sia stato correlato con la comparsa di focolai epidemici di PCV2-SD solo alla fine degli anni '90 o inizio-metà degli anni 2000. È stato ipotizzato che la maggiore prevalenza generale di PCV2a attraverso gli anni abbia determinato principalmente infezioni subcliniche e focolai sporadici di malattia fino a quando, potenzialmente intorno agli anni '90, PCV2b sarebbe diventato molto diffuso, in coincidenza con le gravi epidemie descritte. Inoltre, oltre la diffusione del PCV2b, il commercio internazionale di linee genetiche potenzialmente più sensibili potrebbe aver contribuito a tali epidemie.

Le altre specie, compreso l'uomo, non sono sensibili a PCV2. I topi rappresenterebbero un'eccezione, dal momento che alcuni studi indicano che PCV2 può, in casi limitati, replicare nel topo ed essere trasmesso tra topi. Inoltre, PCV2 è stato rilevato in topi e ratti da allevamenti di suini, ma non nei roditori catturati al di fuori degli allevamenti, suggerendo che questi animali possano agire come potenziali serbatoi attivi o fisici del virus.

La trasmissione orizzontale di PCV2 è stata dimostrata sperimentalmente mettendo a contatto suini naïve (mai venuti a contatto) a suini infetti. È stato riportato che la trasmissione per contatto diretto tra suini è più efficiente della trasmissione tra animali in box separati. La via oro-nasale è considerata la via di trasmissione più importante, ma PCV2 è stato rilevato anche in secrezioni nasali, tonsillari, bronchiali e oculari, feci, saliva, urina, colostro, latte e sperma. Il virus può anche

essere trasmesso a suini naïve alimentati con tessuti crudi di animali viremici. La trasmissione orizzontale della PCV2-SD è stata dimostrata anche mettendo insieme suini malati e sani e ponendo suini infetti e naïve in box adiacenti.

La trasmissione verticale di PCV2 è stata sperimentalmente riprodotta sia mediante infezione transplacentare dopo inoculazione intra-nasale, sia attraverso inseminazione artificiale (artificial insemination, AI) con sperma infetto. L'importanza di PCV2 nei problemi riproduttivi del suino in condizioni naturali rimane ancora incerta. Alcuni studi suggeriscono che la sua presenza è rara o trascurabile, mentre altri riportano percentuali anche elevate (13-46%) di feti abortiti e/o nati morti infetti da PCV2.

La persistenza dell'infezione da PCV2 in un singolo suino od in un gruppo non è stata definitivamente chiarita, sebbene il virus sia stato individuato in vari tessuti prelevati *post mortem* fino a 125 giorni dopo l'inoculazione (post-infection, PI) in suini infettati sperimentalmente. Inoltre, il DNA virale è stato dimostrato nel siero di suini fino a 22 settimane di età in condizioni di campo. Gli studi longitudinali eseguiti per valutare il carico virale di PCV2 in siero, secrezioni nasali e feci, indicano che la maggiore escrezione (trasmissione orizzontale) di PCV2 si verifica tra le 4 e le 15 settimane d'età, a seconda dell'allevamento. Il DNA di PCV2 è stato più volte rilevato in sieri di suini tra 7 e 70 giorni di vita, confermando ulteriormente l'ipotesi che alcuni animali possano essere persistentemente infetti in condizioni di campo, anche in presenza di elevati livelli di anticorpi specifici per PCV2. Un bassa percentuale di scrofe e suinetti può essere viremica durante il periodo di allattamento, dato che avvalorava anche l'ipotesi di una possibile trasmissione del virus da scrofe a suinetti lattanti e mette in evidenza una potenziale via di trasmissione verticale.

Negli ultimi 13 anni sono stati eseguiti alcuni studi epidemiologici caso-controllo. La tabella 21.1 riassume i fattori non infettivi più noti che influenzano lo sviluppo di PCV2-SD. Un certo numero di agenti infettivi, principalmente parvovirus, virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRS) e *Mycoplasma hyopneumoniae*, sono stati descritti come potenziali fattori predisponenti per lo sviluppo della PCV2-SD in condizioni di campo. Tuttavia, l'elenco degli agenti infettivi rilevati in concomitanza a casi di PCV2-SD è molto più ampio (Segalés et al., 2005).

1.4 PATOGENESI ED IMMUNITA'

Le informazioni riguardanti le iniziali manifestazioni dell'infezione da PCV2 e le cellule bersaglio primarie per la replicazione virale sono ancora limitate. Nei suini PCV2-infetti, la quantità di virus più elevata si trova nel citoplasma delle cellule della linea monocitaria/macrofagica. Studi *in vitro* hanno dimostrato che PCV2 è in grado di infettare queste cellule, che rimangono persistentemente infette per lunghi periodi di tempo e, apparentemente, senza nessuna o con una minima replicazione attiva (Chang et al., 2006). È stato pertanto suggerito che i monociti non sarebbero il sito primario di replicazione di PCV2, ma rappresenterebbero un meccanismo di diffusione del virus nell'ospite. Inoltre, PCV2 può causare una compromissione della funzionalità delle cellule dendritiche (dendritic cells, DC) *in vitro*, che può esitare in un profilo alterato delle risposte immunitarie innate e virus-specifiche. Tuttavia, le informazioni *in vivo* su tali effetti sono carenti.

La viremia da PCV2 è rilevabile da circa 7 giorni PI (Segalés et al., 2005), e la carica virale aumenta e raggiunge il picco tra 14 e 21 giorni PI. In condizioni di campo, la siero-conversione si verifica solitamente tra 7 e 12 settimane di età, e gli anticorpi possono persistere almeno fino a 28 settimane di età (Grau Roma et al., 2009). PCV2 può essere rilevato in diversi organi, ma i tessuti linfoidi contengono la quantità più elevata di virus. PCV2 è stato individuato anche in cellule epiteliali del rene e del tratto respiratorio, cellule endoteliali, linfociti, enterociti, epatociti, cellule muscolari lisce, pancreatiche acinose e duttulari.

Il tipo di cellula/e che supporta la replicazione di PCV2 *in vivo* è un argomento ancora controverso. È noto che PCV2 non codifica per le proprie DNA polimerasi e che, probabilmente, sono necessarie cellule in fase replicativa (fase S) per completare il suo ciclo infettivo. Pertanto, si presume che le cellule con elevato indice mitotico siano le più efficienti per la replicazione virale. Alcuni studi datati suggerivano che macrofagi e linfociti non giocassero un ruolo significativo per la replicazione di PCV2, al contrario recenti studi *in vivo* e *in vitro* hanno indicato che tali tipi di cellule (soprattutto i macrofagi) possono supportare la replicazione di PCV2. Inoltre recenti studi ultrastrutturali in colture cellulari e linfonodi da suini con PCVD hanno dimostrato che anche i mitocondri possono svolgere un ruolo nella replicazione di PCV2. Un'ulteriore caratterizzazione di sottopopolazioni di leucociti infetti da PCV2 da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ha indicato che i linfociti T circolanti (CD4⁺ e CD8⁺) principalmente e, in minor misura, i linfociti B potrebbero sostenere la replicazione di PCV2, al contrario dei monociti derivati dalle PBMC (Yu et al., 2007). La replicazione di PCV2 è stata dimostrata anche in cardiomiociti fetali prelevati da feti di suini infettati sperimentalmente. PCV2 è anche in grado di replicare in blastocisti e morule senza zona pellucida prodotte *in vivo*, nonostante l'importanza di questo fenomeno in corso di forma riproduttiva è ancora sconosciuta. Ad oggi, le analisi effettuate su sezioni di tessuti

provenienti da suini con PDNS non hanno significativamente dimostrato la presenza dell'antigene PCV2, o di DNA associato alle lesioni da PDNS (Segalés et al., 2005).

Risposte immunitarie specifiche per PCV2 si sviluppano tra la seconda e la terza settimana post infezione (Grau Roma et al., 2009). La capacità di un suino di produrre una corretta risposta immunitaria adattativa è determinante per evitare la progressione da infezione di PCV2 a PCV2-SD. La produzione di anticorpi anti-PCV2 è seguita da una diminuzione della carica virale ed, eventualmente, dalla scomparsa della viremia. Tuttavia in suini sperimentalmente infetti e sub-clinici, è stata riportata una maggiore durata della viremia o una rilevazione protratta di PCV2 nei tessuti, in concomitanza ad elevati titoli anticorpali di PCV2. Risposte umorali inefficienti e, in particolare, una scarsa produzione di anticorpi neutralizzanti, sono correlate ad un incremento della replicazione virale, con conseguenti gravi lesioni linfoidi ed infine PCV2-SD.

In condizioni di campo, dalla lattazione al periodo di accrescimento-ingrasso, la percentuale di suini infetti da PCV2 ed il carico virale aumentano gradualmente, in coincidenza con il diminuire dell'immunità materna. La maggiore pressione infettiva si rileva al momento della comparsa della malattia, quando i suini colpiti presentano titoli virali più elevati nel siero e nei siti d'escrezione, e una risposta anticorpale più debole rispetto a quelli sub-clinicamente affetti.

Gli embrioni di suino sono sensibili alle infezioni da PCV2 e la loro sensibilità aumenta all'aumentare dello stadio di sviluppo. Inoltre, embrioni infettati da PCV2 *in vitro* degenerano al momento del trasferimento in scrofe riceventi. Sono stati pubblicati anche i risultati clinici e virologici di un'infezione intra-fetale diretta con PCV2 a 57, 75 e 92 giorni di gestazione: a 21 giorni PI si è constatato che PCV2 aveva replicato in tutti i feti inoculati; la replicazione virale era significativamente maggiore nei feti infettati a 57 giorni (Segalés et al., 2005). In questi feti, il cuore presentava lesioni simili ad una miocardite, un più alto carico virale ed un maggior numero di cellule infette. In un'altra sperimentazione, è stata osservata mummificazione in feti infettati a 57 giorni di gestazione ed analizzati al momento della nascita; inoltre PCV2 era presente nei feti vicini non direttamente infettati. I feti infettati a 75 giorni di gestazione erano morti alla nascita, mentre i feti infettati a 92 giorni di gestazione non presentavano alcuna lesione alla nascita. Feti inoculati a 75 o 92 giorni di gestazione presentavano un'elevata positività per PCV2 a livello cardiaco e anticorpi anti-PCV2 alla nascita. In feti inoculati a diverse fasi di gestazione sono state rilevate diversi tipi di cellule infette da PCV2: cardiomiociti, epatociti e cellule della linea monocitaria/macrofagica rappresentavano le popolazioni cellulari sensibili nei feti.

L'inoculazione intranasale di scrofe gravide o l'inseminazione artificiale con seme contaminato sono state associate all'infezione da PCV2 di feti e suinetti neonati e ad insufficienza riproduttiva. In un primo studio, sei scrofe sieronegative per PCV2 sono state infettate con PCV2 per via endonasale 3 settimane prima della data prevista per il parto, tre scrofe hanno abortito e tre hanno

partorito prematuramente. PCV2 e DNA di PCV2 sono stati rilevati nei tessuti linfoidi e non linfoidi dei nati morti e dei suinetti nati vivi, ma non è stata osservata alcuna lesione PCV2-SD-simile o a livello cardiaco nei feti/suinetti analizzati. In un altro studio, sei scrofe naïve sono state fecondate artificialmente con sperma infetto da PCV2 (3 con PCV2a e 3 con PCV2b). Tutte le scrofe che hanno ricevuto lo sperma infetto da PCV2b sono rimaste gravide e hanno portato avanti la gravidanza fino al termine, ma la maggior parte dei loro feti era mummificata e aveva sviluppato lesioni miocardiche in associazione alla presenza del virus, allo stesso modo dei due suinetti nati morti. Le scrofe inseminate con sperma infettato con PCV2a non sono rimaste gravide. Non è stato possibile valutare se questo evento fosse o meno associato ad una precoce morte embrionale causata da PCV2a o da altri fattori sconosciuti. Al contrario, l'inseminazione artificiale con lo sperma di verri infettati sperimentalmente con PCV2 non ha causato problemi riproduttivi o infezione delle scrofe. Pertanto, rimane in dubbio se la quantità di virus naturalmente escreta nel seme sia sufficiente per infettare le scrofe e i loro feti.

È stato suggerito che elevati titoli anticorpali per PCV2 nel siero possano scatenare PDNS, ma questa ipotesi attende ancora conferme sperimentali.

1.5 MODELLI DI RIPRODUZIONE DELLA PCV-SD

La PCV2-SD è una malattia multifattoriale dei suini per la quale è necessaria l'infezione da PCV2 per una piena espressione della condizione clinica (Segalés et al., 2005). Sebbene la PCV2-SD sia stata riprodotta sperimentalmente molte volte, non è ancora stato definito un modello di malattia costantemente ripetibile e definitivo. I modelli di PCV2-SD più ripetibili usano un'infezione da PCV2 associata ad una combinazione di malattie infettive e/o di co-fattori non infettivi. È stato dimostrato sperimentalmente che la stimolazione e/o l'attivazione del sistema immunitario dei suini infettati regola positivamente la replicazione di PCV2 ed aumenta i carichi virali nei tessuti e nel siero, indicando che l'infezione da PCV2 e l'immunostimolazione possono essere eventi cardine nello sviluppo della PCV2-SD (Segalés et al., 2005). Il meccanismo con cui una co-infezione o un'immunostimolazione possano innescare lo sviluppo della malattia sistemica da PCV2 in suini infettati è ancora sconosciuto.

Le motivazioni per cui i modelli di riproduzione della PCV2-SD ottenuti da studi indipendenti risultano inconsistenti non sono note, ma diversi fattori possono spiegare i differenti esiti delle infezioni sperimentali, ad esempio origine dei suini, età degli animali alla vaccinazione, stato immunologico, predisposizione genetica, ceppo di PCV2, via d'inoculo, dose infettante, e via di somministrazione. I risultati di una meta-analisi per valutare le performance delle infezioni

sperimentali con PCV2 hanno indicato che la più alta probabilità di avvicinarsi alla PCV2-SD in condizioni sperimentali si ottiene utilizzando suini di età inferiore a 3 settimane di età, non colostrati, infettati con dosi elevate ($> 10^5$ TCID₅₀/suino) di PCV2b e, preferibilmente, in co-infezione con un altro agente patogeno suino. In questo studio, il genotipo di PCV2 utilizzato nelle infezioni sperimentali sembrava essere un fattore significativo. Questo risultato è coerente con l'ipotesi che i ceppi PCV2b potrebbero essere più virulenti dei ceppi PCV2a. È importante notare, tuttavia, che entrambi i genotipi sono considerati patogeni, poiché sono in grado di causare PCV2-SD utilizzando il modello sperimentale appropriato. Al contrario, uno studio ha indicato che non vi è alcuna differenza nella virulenza tra i due genotipi, mentre un altro lavoro sottolinea differenze nella virulenza all'interno dello stesso genotipo. Pertanto, la differenza potenziale nella virulenza tra genotipi di PCV2 è ancora una questione controversa.

L'approccio più innovativo per riprodurre la PCV2-SD è stata una sperimentazione che prevedeva l'inoculazione con entrambi i genotipi di PCV2 ad un intervallo di 7 giorni. L'infezione con entrambi i genotipi ha indotto una grave malattia in suini SPF (specific pathogen free), che non è stata riprodotta dall'inoculazione di due ceppi dello stesso genotipo (Grau Roma et al., 2009).

Osservazioni di campo hanno suggerito che alcune linee genetiche di suini, in particolare quelle maschili, possono essere più o meno sensibili alla PCV2-SD. Questa osservazione è stata supportata da studi sperimentali in cui suini Landrace sperimentalmente infettati hanno mostrato una maggiore probabilità di sviluppare lesioni da PCV2-SD, rispetto a suini Duroc, Large White e Pietrain. Gli studi sul campo hanno riportato risultati contrastanti con l'uso della linea di cinghiale Pietrain. L'uso di questa linea genetica non ha influenzato la prole in uno studio, mentre in un altro studio è risultato associato ad una generale diminuzione del deperimento e ad una minore mortalità associata a PCV2-SD.

L'ipotesi che i suini affetti da PCV2-SD soffrano di una immunodeficienza acquisita ha portato alla speculazione che PCV2 possa modulare le difese immunitarie dell'ospite. Un certo numero di studi *in vitro* ha recentemente confermato questa ipotesi. L'infezione da PCV2 in DC mieloidi (myeloid dendritic cells, MDC) non ha alterato la loro capacità di elaborare e presentare l'antigene ai linfociti T, né ha interferito con la maturazione delle DC (Segalés et al., 2005). Al contrario, l'interazione con DC plasmocitoidi (plasmacytoid dendritic cells, PDC), note anche come cellule che producono naturalmente interferone (natural IFN producing cells, NIPC), induce una reattività alterata ai segnali di pericolo, il che rappresenta un notevole ostacolo allo sviluppo di una risposta immunitaria adeguata. Inoltre, quando PCV2 viene seminato su colture di macrofagi alveolari (alveolar macrophages, AM) viene osservata un'alterata produzione di alcune citochine e/o chemochine. È stato ipotizzato che questa alterazione della funzionalità degli AM infetti da PCV2 possa favorire la diffusione di PCV2, così come rendere più sensibili i suini ad infezioni opportunistiche e secondarie

polmonari. Allo stesso modo l'aggiunta di PCV2 a colture di PBMC ottenute da animali sani e malati altera il profilo delle citochine prodotte. PCV2 sembra anche modulare le risposte immunitarie specifiche sviluppate dai suini verso altri patogeni, poiché le citochine rilasciate dalle PBMC in risposta all'antigene sono regolate negativamente dal virus. L'effetto inibitorio su alcune di queste risposte citochiniche è risultato mediato dal rilascio di IL-10 indotto da PCV2. *Ex vivo*, l'aumento dei livelli di questa citochina nel siero di suini PCV2-infetti sono stati associati con lo sviluppo di PCV2-SD (Rossel et al., 2000). Dati recenti suggeriscono che le cellule che producono IL-10 sono di origine mieloide e linfoide, ma non sono o sono raramente infettate da PCV2.

È stata anche analizzata l'implicazione di diverse componenti di PCV2 nella modulazione della risposta immunitaria. È stato dimostrato che la compromissione PCV2-indotta della funzione delle DC non richiede la replicazione virale ed è mediata dal solo DNA virale.

È stato indicato anche che è necessaria una concentrazione minima di DNA a doppio filamento (ds)DNA (forma replicativa) per mediare tale inibizione (Segalés et al., 2005). Nelle PBMC, la soppressione indotta da PCV2 sulle citochine rilasciate è stata associata alla presenza del virus intero e di certe sequenze di DNA derivate dal suo genoma. Al contrario, particelle virus-simili virus-like particles, VLP) a PCV2 non hanno mostrato alcun effetto di soppressione, né hanno modulato le risposte dell'IFN- α .

La prova più evidente di immunosoppressione è data dalle estese lesioni osservate nei tessuti linfoidi di suini affetti da PCV2-SD. Queste lesioni includono deplezione dei linfociti B e T, associata ad un aumento del numero di macrofagi ed alla perdita o alla ridistribuzione di cellule dendritiche inter-follicolari. Nei tessuti linfoidi, la deplezione dei linfociti T sembra coinvolgere principalmente le cellule CD4⁺ e, in misura minore, le cellule CD8⁺. Un'altra caratteristica dell'immunosoppressione nei suini colpiti da PCV2-SD è l'alterazione delle sottopopolazioni delle PBMC, principalmente linfopenia. La deplezione di linfociti B e T è stata sperimentalmente osservata solo in suini infettati con PCV2, che hanno sviluppato PCV2-SD, a partire dal giorno 7 PI, e si è aggravata al momento della comparsa dei sintomi clinici. I cambiamenti nelle sottopopolazioni delle cellule T hanno coinvolto soprattutto le cellule T memoria CD4⁺ CD8⁺. Viceversa, nei suini infettati, ma che non presentavano sintomi clinici, il numero di linfociti T citotossici (CD4⁻CD8⁺) e $\gamma\delta$ (CD4⁻CD8⁻) è risultato aumentato in confronto al numero nei suini del gruppo di controllo, suggerendo in tal modo una risposta attiva all'infezione da PCV2.

La deplezione linfocitaria e la linfopenia sono caratteristiche costanti dei suini colpiti da PCV2-SD (Segalés et al., 2005). Tuttavia, non è ancora noto se la deplezione di linfociti sia un effetto diretto dell'infezione da PCV2 o una conseguenza indiretta delle risposte all'infezione. Alcuni autori hanno ipotizzato che la deplezione linfocitaria sia un risultato dell'apoptosi virus-indotta. Tuttavia, i risultati ottenuti in altri studi sono discordanti. In un recente lavoro è stato osservato che PBMC

infette da PCV2 mostravano cambiamenti morfologici tipici della degenerazione cellulare. Inoltre, è stato dimostrato *in vivo* che linfociti B e T, anche se in percentuale minore, possono supportare la replicazione di PCV2. È ancora da chiarire se quest'ultimo fatto sia alla base della grave deplezione linfocitaria osservata nei suini affetti da PCV2-SD.

Le risposte immunitarie umorali contro PCV2 sono oggi ben note. Gli anticorpi colostrali solitamente declinano durante il periodo sottoscrofa e lo svezzamento, seguiti da una sieroconversione attiva durante il periodo di accrescimento-ingrasso (Segalés et al., 2005). La PCV2-SD di solito non si osserva nei suini di età inferiore alle 4 settimane, il che suggerisce che determinati livelli di immunità materna sono protettivi nei confronti dello sviluppo di PCV2-SD. La maggior parte delle indagini sierologiche pubblicate si basa sul rilevamento di anticorpi totali (total antibodies, TA) anti-PCV2, senza determinare la loro attività neutralizzante. In campo, la sieroconversione per TA si verifica sia nei suini con infezione sub-clinica, sia in suini con PCV2-SD. Alcuni studi di campo non hanno rilevato alcuna differenza tra suini con o senza PCV2-SD, per quanto riguarda i titoli di TA, mentre altri lavori riportano risposte umorali più deboli nei suini malati. In condizioni sperimentali, le risposte ritardate e il basso titolo di TA sono stati correlati all'espressione clinica di PCV2-SD. La maggior parte di questi studi hanno dimostrato che PCV2 persiste nei tessuti e nel sangue anche in presenza di alti titoli di TA, tuttavia, tali analisi non hanno fatto emergere differenze tra anticorpi neutralizzanti (NA) e non neutralizzanti. È stato dimostrato che suini PCV2-infetti sviluppano NA specifici per PCV2. In condizioni sperimentali, gli NA vengono prodotti tra 10 e 28 giorni PI e bassi titoli sono risultati correlati all'aumento della replicazione di PCV2 ed allo sviluppo di PCV2-SD. Finora, solo uno studio ha indagato le dinamiche degli NA in suini naturalmente infetti. È stato dimostrato che gli anticorpi neutralizzanti della madre sono stati trasferiti passivamente a tutti i suinetti e nessuno di quelli che ha poi sviluppato PCV2-SD ha sierconvertito per NA. Un altro studio ha mostrato che i livelli di NA sono correlati con lo stato clinico-patologico di suini naturalmente infetti.

Le risposte immunitarie cellulo-mediate nei confronti di PCV2 non sono così profondamente conosciute come le risposte umorali. I suini infetti subclinicamente da PCV2 sviluppano specifiche risposte umorali e cellule T, anche se con una cinetica relativamente lenta. La cinetica delle risposte associate alle cellule T helper e T citotossiche, misurata dal numero di cellule secernenti (SC) interferone (IFN)- γ , dipende dal singolo animale ed anche dal momento PI in cui le cellule vengono testate. Le conoscenze attuali sulla risposta immunitaria adattativa nei confronti di PCV2 suggeriscono che la risposta cellulo-mediata, misurabile come numero di IFN- γ -SC, insieme ad una significativa risposta anticorpale neutralizzante, è responsabile della clearance virale in animali infetti. Si ipotizza che un difetto in una o l'altra o in entrambe le risposte potrebbe comportare lo sviluppo di PCV2-SD (Segalés et al., 2005).

1.6 SINTOMATOLOGIA E LESIONI

Malattia sistemica da circovirus suino tipo 2 (PCV2-SD)

PCV2-SD colpisce solitamente suini di 2-4 mesi di età. La morbilità negli allevamenti colpiti varia generalmente dal 4 al 30% (occasionalmente dal 50 al 60%) e la mortalità dal 4 al 20% (Segalés e Domingo, 2002). Dal punto di vista clinico PCV2-SD è caratterizzata da deperimento, pallore cutaneo, difficoltà respiratorie, diarrea, e, occasionalmente, ittero (Harding e Clar, 1997). Un aumento di volume dei linfonodi sottocutanei è il riscontro più comune nelle iniziali fasi cliniche di PCV2-SD (Segalés et al., 2004).

Le lesioni da PCV2-SD si rilevano principalmente nei tessuti linfoidei e l'aumento di volume dei linfonodi è la caratteristica più importante della fase clinica iniziale di PCV2-S).



Figura 2 . Suino: linfadenomegalia degli inguinali superficiali (IZSLER, sez. RE)



Figura 3 . Suino: significativo aumento dei linfonodi inguinali (IZSLER, sez. RE)

Linfonodi di dimensioni normali, o addirittura atrofici vengono solitamente rilevati nelle fasi più avanzate di PCV2-SD (Clark, 1997; Rossel et al., 1999) e il timo è spesso atrofizzato nei suini malati. Le lesioni linfoidei istopatologiche osservate nei suini colpiti sono caratterizzate da deplezione dei linfociti con infiltrazione di grandi cellule istiocitarie e cellule multinucleate giganti.

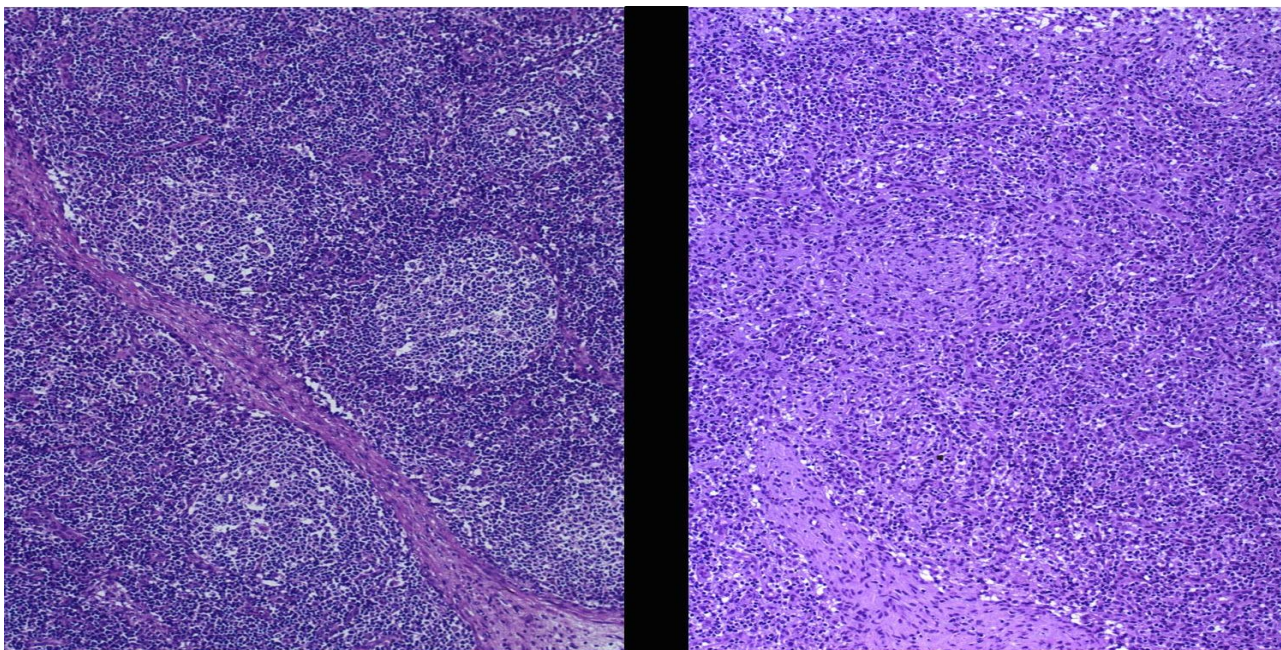


Figura 4 . Linfonodi inguinali superficiali. Linfonodo normale da soggetto sano (a sinistra) confrontato con uno ottenuto da un soggetto affetto da PCV2-SD con grave deplezione linfocitaria (a destra). Colorazione Ematossilina-Eosina. (Le patologie del maiale, PVI 2013).

Nel timo, la lesione principale è un'atrofia corticale. Inclusioni citoplasmatiche virali possono essere rilevate in istiociti e cellule dendritiche.

I polmoni possono essere aumentati di volume, non collassati, e di consistenza elastica, in una distribuzione diffusa o a chiazze. Questi risultati corrispondono a quelli microscopici di una polmonite interstiziale. Nei casi più avanzati si riscontra fibrosi peribronchiale e bronchiolite fibrinosa.

In alcuni casi di PCV2-SD, il fegato è ingrossato o atrofizzato, pallido, con una superficie finemente granulare che corrisponde a cambiamenti citopatici microscopici diffusi e infiammazione. I suini possono mostrare ittero generalizzato in uno stadio avanzato di malattia. Le lesioni microscopiche nel fegato possono variare da lieve epatite linfo-istiocitaria ad un'infiammazione massiccia, con corpi apoptotici, disorganizzazione epatica e fibrosi perilobulare. Alcuni suini mostrano spot bianchi nella corteccia del rene (nefrite interstiziale non purulenta) (Segalés et al., 2004). Foci di infiltrati infiammatori linfo-istiocitarie possono essere rilevati in molti tessuti di suini affetti da PCV2-SD. Sono state occasionalmente descritte lesioni cerebrali consistenti fondamentalmente in una vasculite.

LESIONE MACROSCOPICA	%
Deperimento ^a	80,3
Polmoni che non collassato, screziati marrone rossiccio ^a	64,4
Consolidamento polmonare (bronicopolmonite)	59,3
Aumento di volume di almeno un linfonodo (linfadenopatia) ^a	52,8
Ulcere gastriche nella <i>pars oesophagea</i>	28,5
Sierosite (mono-polisierosite)	25,0
Atrofia sierosa del grasso	22,7
Presenza di foci biancastri a livello renale ^a	18,4
Feci morbide a livello del retto (colite catarrale associata a diarrea)	11,1
Atrofia epatica ^a	3,3
Colite fibrino-necrotizzante	3,3
Ittero ^a	2,3
Necrosi linfonodale ^a	2,3
Polmonite necrotizzante	2,0
Epatomegalia	0,5

Tabella 1. Lesioni macroscopiche associate a PCV2-SD. Segalés et al. 2004

Infezione subclinica da circovirus suino di tipo 2 (PCV2-SI)

L'uso dei vaccini per PCV2 negli ultimi 5 anni ha evidenziato l'importanza dell'infezione subclinica da PCV2. Tale forma non è evidente se in allevamento non sono controllati di routine i parametri produttivi, dato che PCV2-SI è caratterizzata da una diminuzione dell'incremento ponderale giornaliero senza ulteriori sintomi clinici evidenti. Da un punto di vista patologico, i suini affetti da PCV2-SI, non presentano lesioni macroscopiche e possono mostrare o meno lesioni istopatologiche. Quando presenti, le lesioni microscopiche sono simili a quelle descritte per la PCV2-SD nei tessuti linfoidi, ma sono di lieve entità (Opriessnig et al., 2007).

Sindrome della dermatite - nefrite del suino (PDN)

PDNS colpisce suini di tutte le età. La prevalenza della sindrome è generalmente inferiore all'1% (Segalés et al, 1998), sebbene sia stata descritta anche una frequenza più alta. La mortalità si avvicina al 100% nei suini di età superiore ai 3 mesi di vita, rispetto a circa il 50% nei suini più giovani. La forma è solitamente acuta e grave e porta alla morte entro pochi giorni dalla comparsa dei sintomi clinici. I suini che sopravvivono tendono a recuperare peso dopo 7-10 giorni dall'inizio della sindrome (Segalés et al, 1998).

I suini colpiti da PDNS sono anoressici e depressi, con piressia lieve o assente. Possono essere abbattuti, riluttanti a muoversi, e/o rigidi alla deambulazione. Il sintomo più evidente di PDNS è la

presenza di macchie e papule irregolari rosso-violacee sulla cute, soprattutto a livello di arti posteriori e zona perineale, che a volte tendono ad estendersi maggiormente .



Figura 5 . Sindrome dermatite nefrite (IZSLER, sez. RE)

Con il tempo, le lesioni si ricoprono di croste scure . Le lesioni tendono poi a svanire, lasciando a volte cicatrici (Drolet et al., 1999). Le lesioni analizzate istologicamente sono caratterizzate da tessuto necrotico ed emorragico associato a vasculite necrotizzante (Segalés et al., 1998). Quest'ultima è una caratteristica sistemica.

I suini che muoiono per PDNS acuta presentano reni aumentati di volume con superficie corticale finemente granulare, piccole lesioni corticali rossastre puntiformi, ed edema della pelvi renale. Queste lesioni corrispondono ad un glomerulite fibrino-necrotizzante con nefrite interstiziale non purulenta (Segalés et al., 1998). I suini che sopravvivono più a lungo possono presentare una glomerulonefrite cronica. Normalmente, in corso di PDNS sono presenti entrambe le lesioni cutanee e renali, ma in alcuni casi, possono essere rilevate solo lesioni a carico del rene o della cute. I linfonodi possono essere aumentati di volume e di colore rosso. Possono essere presenti anche infarti splenici. Microscopicamente, sono spesso riportate lesioni linfoidi simili a quelle di PCV2-SD (Rossel et al., 2000).

Forma riproduttiva da circovirus suino di tipo 2 (PCV2-RD)

PCV2 è stato associato ad aborti a termine e nati mortalità (West et al., 1999). Tuttavia, in condizioni di campo la malattia riproduttiva associata a PCV2 viene raramente riscontrata. Questo, probabilmente, perché la sieroprevalenza di PCV2 nei suini adulti è alta e, pertanto, la maggior parte degli allevamenti non è sensibile alla forma clinica. Nella forma riproduttiva PCV2-associata, i suinetti nati morti e disvitali alla nascita presentano congestione epatica cronica, passiva e ipertrofia cardiaca con aree multifocali di scolorimento del miocardio. La principale lesione microscopica corrisponde ad una miocardite non suppurativa, fibrotica e/o necrotica (O'Connor et al., 2001).

Dati sperimentali suggeriscono che PCV2 potrebbe essere associato a quadri di ritorno in estro, in quanto il virus può replicare a livello di embrioni e potrebbe quindi portare alla morte embrionale. È importante sottolineare che, in una piccola percentuale di embrioni, l'esposizione a PCV2 non ha avuto un effetto negativo sullo sviluppo dell'embrione entro i primi 21 giorni di gravidanza. Tuttavia, l'importanza specifica di questi dati sperimentali in condizioni di campo non è ancora stata dimostrata.

L'influenza di PCV2 nelle forme riproduttive in allevamento può essere valutata attraverso la vaccinazione di scrofette e scrofe. Nonostante l'uso dei vaccini per prevenire la PCV2-RD sia molto limitato in tutto il mondo, ci sono studi che hanno individuato nell'utilizzo di vaccini per PCV2 un metodo utile per la prevenzione degli aborti, l'aumento della fertilità e la riduzione del ritorno in calore di scrofe e scrofette.

1.7 DIAGNOSI

Sono stati sviluppati diversi metodi per rilevare PCV2 nei tessuti, quelli più utilizzati per la diagnosi delle PCVDs sono *ibridazione in situ* (in situ ibridization, ISH) e immunoistochimica (immunoistochemistry, IHC). Negli animali colpiti da PCV2-SD e PDNS il virus o il DNA virale si rilevano nel citoplasma di istiociti, cellule giganti multinucleate e di altre cellule della linea monocitaria/macrofagica, così come in altri tipi di cellule. Nei suini con PCV2-RD, il virus è principalmente localizzato nei miocardiociti.

È stata osservata una correlazione significativa tra quantità di PCV2 nei tessuti e gravità delle lesioni linfoidi microscopiche in corso di PCV2-SD.

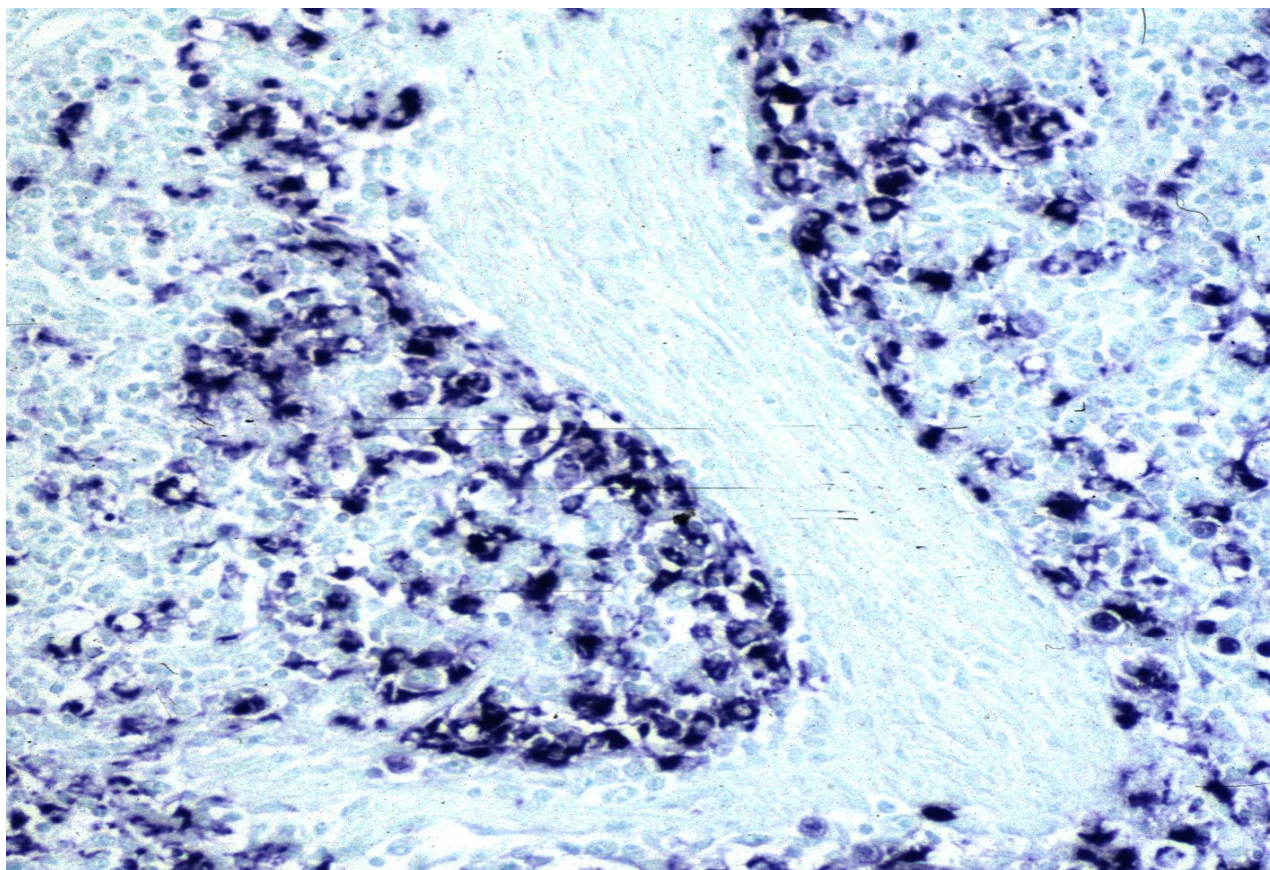


Figura 6. Linfonodi inguinali superficiali. Da moderato ad alto contenuto di acido nucleico di PCV2 su cellule macrofagiche in un soggetto affetto da PCV2-SD. Ibridazione in situ per dimostrare la presenza di PCV2, colorazione di contrasto *fast green*. (Le patologie del maiale, PVI 2013)

Dato che la quantità di PCV2 nei tessuti danneggiati rappresenta la principale differenza tra suini colpiti da PCV2-SD e suini con PCV2-SI, le tecniche che permettono la quantificazione di PCV2 nei tessuti e/o nel siero potrebbero essere potenzialmente utilizzate per diagnosticare una PCV2-SD. Tuttavia, le tecniche di PCR quantitativa non sono particolarmente specifiche e sensibili su campioni di singoli soggetti. La PCR quantitativa sembra essere una tecnica affidabile per diagnosticare la PCV2-SD su base di popolazione, ma non è in grado di sostituire l'istopatologia nel rilevamento di PCV2 nei tessuti per una diagnosi di PCV2-SD in un singolo soggetto. Le tecniche di PCR non quantitativa non dovrebbero essere utilizzate per diagnosticare le PCVDs, dato che il virus risulta ubiquitario e spesso è presente anche in assenza di una forma clinica. Tuttavia, possono essere utili come test per il monitoraggio dell'infezione da PCV2.

La diagnosi sierologica di PCVDs è problematica, se si considera che PCV2 è ubiquitario ed i modelli di sieroconversione sono relativamente simili tra allevamenti affetti o meno da PCV2-SD. Negli ultimi anni, l'interesse nei confronti della dinamica degli anticorpi verso PCV2 è aumentato, soprattutto in relazione al monitoraggio dell'efficacia vaccinale e alla valutazione di una potenziale interferenza dell'immunità materna sulla vaccinazione.

La replicazione dei PCVs *in vitro* si ottiene mediante inoculazione su monostrati semi-confluenti di PK-15 PCV-free. I PCVs non sono citopatici, la crescita virale viene quindi monitorata mediante immunofluorescenza o immunoperossidasi. La replicazione del DNA virale sembra essere dipendente dalla presenza di enzimi cellulari espressi durante la fase S di crescita o, forse, durante la riparazione cellulare. La crescita virale può essere favorita dal trattamento delle cellule con glucosamina, tuttavia è necessario porre attenzione vista la tossicità cellulare di questo prodotto. L'isolamento virale viene però considerato uno strumento di scarsa utilità nella diagnosi di PCVDs, essendo una metodica lunga, costosa, che può essere facilmente sostituita dalle tecniche di rilevamento precedentemente descritte.

Per quanto riguarda la diagnosi differenziale deve essere fatta rispetto alla forma respiratoria da PRRS ed a tutte le malattie e le condizioni patologiche che causano deperimento. Per la PDNS, le diagnosi differenziali includono qualsiasi condizione che provoca lesioni cutanee simili o petecchie emorragiche nei reni. In particolare devono essere considerate le lesioni macroscopiche indotte da Peste Suina Classica, Peste Suina Africana e Mal Rosso. La PCV2-RD è clinicamente indistinguibile da altre patologie del suino che causano aborti a termine e natimortalità.

Di seguito vengono riportati i criteri diagnostici specifici per le diverse forme patologiche associate a PCV2.

Malattia sistemica da circovirus suino di tipo 2 (PCV2-SD)

Un suino o un gruppo di suini sono affetti da PCV2-SD, se presentano: 1) ritardo nella crescita e deperimento, spesso con dispnea e linfonodi inguinali aumentati di volume, talvolta con ittero, 2) lesioni istopatologiche dei tessuti linfoidei da lievi a gravi, e 3) quantità da basse ad elevate di PCV2 a livello di lesioni linfoidei e di altri tessuti colpiti (Sorden, 2000).

Questa definizione non esclude la presenza concomitante di altre patologie. I sintomi clinici e le lesioni macroscopiche osservate non sono quindi sufficienti per diagnosticare la malattia. La diagnosi d'allevamento di PCV2-SD si basa sulla presenza di segni clinici di deperimento, mortalità aumentata rispetto ai livelli abituali dell'allevamento e sulla diagnosi individuale di PCV2-SD, come descritto in precedenza, in un certo numero di suini (Segalés et al., 2003).

La definizione presentata è molto utile in uno scenario di epizoozia. Infatti l'evoluzione della PCV2-SD ad una forma cronica, meno grave (mortalità inferiore e quadro clinico scarsamente evidente), rende più difficoltosa la diagnosi di sospetto in aziende potenzialmente affette da PCV2-SD, che in seguito rispondono positivamente alla vaccinazione con PCV2.

Infezione subclinica da circovirus suino di tipo 2 (PCV2-SI)

L'ubiquità di PCV2 in tutto il mondo rende estremamente elevata la probabilità che un allevamento sia infetto da questo virus. Un allevamento senza sintomatologia clinica riferibile a PCVDs, ma con una conferma diagnostica di PCV2 (mediante PCR o sierologia) è, per definizione, un allevamento sub-clinicamente infetto da PCV2. I criteri per la diagnosi di questa infezione comprendono: 1) la mancanza di segni clinici evidenti 2) nessuna o lievi lesioni istopatologiche nei tessuti linfoidi (principalmente) e 3) una bassa quantità di PCV2 in alcuni tessuti (linfoidi). I criteri 2 e 3 possono potenzialmente essere sostituiti dal rilevamento di PCV2, ad esempio mediante PCR standard.

Sindrome dermatite-nefrite del suino (PDNS)

La diagnosi di PDNS si basa su due criteri principali: 1) presenza di lesioni cutanee emorragiche e necrotizzanti, principalmente a livello di arti posteriori e zona perineale, e/o di reni aumentati di volume, pallidi con petecchie corticali, e 2) presenza di vasculite sistemica necrotizzante, e glomerulonefrite necrotizzante e fibrinosa (Helie et al., 1995).

Da un punto di vista diagnostico, il rilevamento di PCV2 non è attualmente incluso nei criteri diagnostici di PDNS.

Forma riproduttiva da circovirus suino di tipo 2 (PCV2-RD)

La diagnosi di malattia riproduttiva associata a PCV2 dovrebbe includere tre criteri: 1) aborti a termine e natimortalità, a volte in associazione ad evidente ipertrofia del cuore nei feti, 2) presenza di lesioni cardiache caratterizzate da miocardite fibrosa e/o necrotizzante, e 3) presenza di elevate quantità di PCV2 a livello di lesioni miocardiche e di altri tessuti fetali (West et al., 1999).

Studi recenti hanno suggerito che questa definizione è utile per diagnosticare problemi riproduttivi in fase acuta, mentre la PCR quantitativa può essere utilizzata come metodo diagnostico sensibile in arco di tempo più ampio. La sierologia come indice di infezione intrauterina non è un metodo diagnostico affidabile.

Nonostante non vi sia una dimostrazione in campo, è stato ipotizzato che il ritorno in estro dovuto all'infezione da PCV2 possa essere confermato da una sieroconversione seguente il ritorno in calore e/o dalla positività in PCR per PCV2 in prossimità del ritorno in calore.

1.8 PREVENZIONE E CONTROLLO

Pur essendo la PCV2-SD una malattia multifattoriale, i vaccini per PCV2 si sono mostrati efficienti nel controllo della malattia. Prima dell'avvento del primo vaccino per PCV2 sul mercato, le misure di controllo erano focalizzate sull'individuazione e l'eliminazione dei co-fattori e dei fattori predisponenti coinvolti nella patogenesi della malattia.

Si è ipotizzato, ad esempio, che le condizioni ambientali siano in grado di modificare l'espressione della malattia. L'attuazione del "piano a 20 punti di Madec", un elenco di pratiche gestionali volte a ridurre l'impatto della malattia, ha diminuito significativamente la mortalità in allevamenti gravemente colpiti (Madec et al., 2000).

Anche co-infezioni batteriche o virali sono state considerate fattori predisponenti per lo sviluppo di PCV2-SD e il controllo delle infezioni virali e batteriche nel periodo post-svezzamento può contribuire alla diminuzione dell'incidenza di PCV2-SD. Come indicato in precedenza, alcuni studi sperimentali e di campo hanno suggerito che l'attivazione o la stimolazione immunitaria possono essere un importante fattore scatenante la PCV2-SD in alcuni allevamenti. Tuttavia, se si considera il problema da un punto di vista pratico, escludere la vaccinazione potrebbe essere più dannoso, che vaccinare e indurre PCV2-SD in una bassa percentuale di suini. Pertanto, negli allevamenti colpiti da PCV2-SD, per ridurre potenzialmente la malattia, si dovrebbero determinare approssimativamente la tempistica dell'infezione da PCV2, con l'obiettivo finale di ri-programmare la tempistica della vaccinazione.

È stato riportato che l'infezione da PCV2 e/o il riscontro di bassi titoli sierologici per PCV2 in scrofe al parto ha aumentato la mortalità complessiva della nidiata dovuta a PCV2-SD. Di conseguenza le misure in grado di aumentare l'immunità materna e diminuire la viremia della scrofa al parto dovrebbero diminuire anche la mortalità dei suinetti da PCV2-SD in allevamenti problema. Questa ipotesi è stata confermata anche in condizioni di campo, vaccinando le scrofe con un vaccino inattivato e con adiuvante per PCV2.

Alcuni studi hanno ipotizzato che anche i cambiamenti alimentari in suini infetti inducano un parziale controllo di PCV2-SD in alcune aziende, ma i risultati ottenuti sono contraddittori. Un solo studio indica che l'acido linoleico coniugato (CLA) ha migliorato gli effetti dell'infezione sul sistema immunitario, ma non sono stati pubblicati altri studi a conferma di questo dato (Bassaganya-Riera et al., 2003).

L'iniezione sottocutanea di suinetti lattanti o in svezzamento con siero di suini in età da macellazione ("siero-terapia") è stata utilizzata nel tentativo di ridurre la mortalità in diverse aziende colpite da PCV2-SD (Ferreira et al., 2001). Tuttavia, i risultati di questa procedura sono

risultati variabili e, a volte, addirittura negativi, considerando anche che l'uso della "siero-terapia" presenta notevoli rischi sanitari in termini di biosicurezza.

In seguito alla dimostrazione del coinvolgimento di PCV2 come agente essenziale nella PCV2-SD sono aumentati gli sforzi per la progettazione di prototipi di vaccini efficaci da sperimentare in modelli in vivo. Tali prototipi comprendono vaccini inattivati, vaccini a DNA e vaccini a subunità ricombinanti, che esprimono le proteine virali di PCV2. Dal 2007, sono diventati disponibili sul mercato vari vaccini commerciali. Il primo vaccino sul mercato è stato un vaccino inattivato (Reynaud et al., 2004), con adiuvante oleoso, da utilizzare in scrofe e scrofette a 2-4 settimane prima del parto. Gli altri tre prodotti commerciali ad oggi disponibili, sono vaccini ricombinanti progettati per suini in accrescimento, di 2-4 settimane o più d'età, mediante una o due somministrazioni. Due di questi sono vaccini a subunità basati sull'espressione della ORF2 di PCV2, ossia la proteina capsidica Cap in un sistema a baculovirus. Il quarto vaccino contiene invece un virus chimerico inattivato che esprime il gene del capside ORF2 di PCV2 sullo scheletro del genoma di un PCV1 non patogeno (Fenaux et al., 2003). Tutti e quattro i vaccini utilizzano ceppi appartenenti al genotipo PCV2a.

Alcuni studi hanno mostrato che in suini in accrescimento vaccinati o nati da riproduttori vaccinati si osserva una notevole riduzione delle perdite produttive associate a PCV2. I vaccini utilizzati in questi studi hanno diminuito morbidità e mortalità associate a PCV2-SD, e migliorato l'incremento medio giornaliero (da 10 a 40 g/die nei suini vaccinati rispetto ai controlli non vaccinati), il tasso di conversione degli alimenti e l'omogeneità di dimensioni/peso. Inoltre, la vaccinazione ha anche indirettamente diminuito le co-infezioni e l'utilizzo di antibiotici. Infine, nei suini vaccinati sono risultati diminuiti anche il carico virale nel siero e nei tessuti e la gravità delle lesioni linfoidi da PCV2-SD. Oggi si discute molto sulla possibilità di utilizzare i vaccini per PCV2 per migliorare i parametri produttivi in allevamenti in cui non si verificano focolai clinici di PCV2-SD. Prove in campo hanno evidenziato che i vaccini sono in grado di migliorare i parametri produttivi (incremento medio giornaliero, percentuale di scarti, body condition score e peso della carcassa) in presenza di PCV2-SI. Questi dati farebbero ipotizzare che se la vaccinazione per PCV2 limita gli effetti dell'infezione subclinica in termini di costi-benefici, l'utilizzo di tale vaccinazione sarebbe giustificato in qualunque situazione di infezione da PCV2, indipendentemente dall'insorgenza o meno di malattia clinica. Inoltre, se PCV2 è un virus ubiquitario, questo significa che l'agente è virtualmente presente in tutte gli allevamenti. Di conseguenza, la vaccinazione sistematica avrebbe senso in tutti gli allevamenti suini. Ciononostante sono necessari ulteriori studi sull'effetto dei vaccini in contesti d'infezione subclinica per confermare queste ipotesi.

Alcuni dati indicano che la vaccinazione per PCV2 nelle scrofe induce un aumento della fertilità ed una riduzione dei ritorni in estro di scrofe e scrofette, se questo dato venisse confermato

sottolineerebbe un ruolo significativo dell'infezione da PCV2 nei problemi di fertilità in condizioni di campo. In uno studio sperimentale è stato valutato l'effetto positivo della vaccinazione delle scrofe nell'impedire l'infezione fetale e i problemi riproduttivi. Scrofe gravide negative per PCV2 sono state divise in due gruppi, il primo gruppo è stato vaccinato al 28° giorno di gestazione, a differenza del secondo al quale è stato somministrato un placebo. Indipendentemente dal gruppo tutte le scrofe sono risultate infette il 56° giorno di gestazione. I risultati di questo studio indicano che la trasmissione verticale di PCV2 può verificarsi anche in scrofe vaccinate per PCV2, anche quando si è ottenuta una protezione clinica. Nello studio descritto è stato utilizzato un vaccino a subunità in commercio. Nonostante ci siano criteri condivisi per diagnosticare la PCV2-RD mediante l'analisi dei feti, ci sono ancora molte lacune sui reali effetti dell'infezione da PCV2 sui parametri riproduttivi, così come sull'infezione subclinica di scrofa e feti. In generale sono ancora carenti anche i dati sugli effetti della vaccinazione rispetto alle performance riproduttive del suino. L'efficacia dei vaccini per PCV2 si basa principalmente sull'effetto protettivo degli anticorpi anti-PCV2, sia acquisiti passivamente (vaccinazione della scrofa) che indotti attivamente (vaccinazione del suinetto). Tuttavia, basse risposte anticorpali o un mancato sviluppo di anticorpi dopo la vaccinazione, non sono necessariamente correlati ad una mancanza di protezione. Si presume che l'immunità cellulo-mediata sia importante per l'immunità protettiva. In uno studio recente è stato dimostrato lo sviluppo dell'immunità cellulo-mediata in suinetti vaccinati con un vaccino a subunità, andando a verificare la produzione di IFN- γ -SC PCV2-specifiche indotta negli animali vaccinati. È interessante notare che gli alti livelli di anticorpi materni possono interferire con la sieroconversione dopo vaccinazione attiva, anche se non è stato ancora sufficientemente studiato l'effetto sull'efficacia vaccinale in condizioni di campo.

2 - PARTE SPERIMENTALE

2.1 MATERIALI E METODI

2.1.1. Anamnesi di allevamento

Lo studio è stato condotto nel Nord Italia, in un allevamento selezionato in base alla sua storia relativa alla patologia associata a Circovirus (PCVD). L'azienda, a ciclo chiuso, era costituita da una mandria di 1200 scrofe e, negli anni precedenti, aveva accusato mortalità nei periodi di svezzamento e ingrasso a causa di malattia associata a PCV-2, diagnosticata secondo la "definizione di caso di malattia" riconosciuta a livello internazionale, tra cui segni clinici, lesioni macroscopiche, risultati istopatologici e presenza di PCV-2 nelle lesioni linfonodali (Segalés et al., 2005). La sieropositività a PCV-2 è stata dimostrata in tutte le categorie di animali (scrofette, scrofe, suini in svezzamento, all'ingrasso e al finissaggio).

Dall'insorgenza della malattia, i suinetti sono stati vaccinati a 3 settimane di età; anche scrofette e scrofe sono state vaccinate ad ogni inseminazione. Immediatamente prima dell'inizio dello studio non sono stati registrati segni clinici di PCVD-SD. Indagini diagnostiche effettuate sui tessuti linfoidei di suini morti di età superiore a 15 settimane di età, non hanno dimostrato alcuna lesione specifica da PCV-2; molto basso infine era il titolo virale diagnosticato mediante PCR, indicativo di infezioni subcliniche (PCVD-SI).

Il coinvolgimento del virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV) nella mandria è stato dimostrato dalla positività ripetuta al virus stesso mediante PCR in associazione a malattie respiratorie, con coinvolgimento di batteri secondari comuni (*Streptococcus* spp., *Pasteurella multocida*).

L'allevamento era risultato sieronegativo per il virus della malattia di Aujeszky (ADV) e per *A. pleuropneumoniae* e invece sieropositivo per *M. hyopneumoniae*.

Le scrofe sono state vaccinate contro la Malattia di Aujeszky (3 volte/anno), Parvovirus del Suino, Mal rosso (entrambi a metà lattazione) e virus dell'Influenza Suina (SIV).

I suinetti sono stati vaccinati contro *M. hyopneumoniae* in singola dose ad una settimana di età e contro la Malattia di Aujeszky in base al programma di controllo nazionale.

2.1.2. Progetto sperimentale

Questo studio è stato una prova di campo, in doppio cieco, eseguita secondo i principi di "buona pratica clinica".

Lo studio è stato condotto su tre successivi cicli produttivi (repliche).

All'inizio, 46 scrofette sono state ammesse alla prova, identificate singolarmente mediante marche auricolari, fecondate, vaccinate ed è stato effettuato loro un prelievo di sangue. Al primo, secondo e terzo parto, le scrofe sono state ri-vaccinate dopo la fecondazione ed è stato effettuato loro un ulteriore prelievo di sangue. I suinetti nati ad ogni parto (primo, secondo e terzo) sono stati divisi in quattro gruppi differenti sulla base dell'età di vaccinazione stabilita. Il giorno del reclutamento tutti i suinetti sono stati identificati mediante doppia marca auricolare, numerati e assegnati ai gruppi di trattamento (100/gruppo) in base ai tempi di vaccinazione previsti.

I gruppi sono stati vaccinati rispettivamente a 4 settimane di età (giorno dello svezzamento, gruppo A), a 6 settimane di età (gruppo B), a 8 settimane di età (gruppo C). Al rimanente gruppo di suinetti (gruppo D) non è stata effettuata la vaccinazione ma solamente l'iniezione dell'adiuvante in quanto considerato gruppo di controllo. I suinetti sotto scrofa sono stati assegnati ai vari gruppi in modo sequenziale (A - B - C - D - A - B - C - D ... ecc) e continuativo nelle varie nidiate.

L'identificazione della scrofa e la data di nascita dei suinetti sono stati registrati.

Gli animali sono stati vaccinati secondo lo schema riportato sopra con un vaccino commerciale a subunità per PCV-2, genotipo a (Porcilis PCV[®], MSD Animal Health, Boxmeer, Paesi Bassi), contenente la proteina capsidica (Cap) di PCV2 espressa in un sistema a baculovirus, risospesa in adiuvante a base di α -tocoferolo acetato e paraffina liquida, somministrato in singola dose (2 ml) per via intramuscolare sul lato sinistro del collo secondo le raccomandazioni del produttore. I controlli non vaccinati hanno ricevuto la stessa quantità di adiuvante (2 ml) per iniezione intramuscolare nel lato sinistro del collo a 4 settimane di età. Allo svezzamento, gli animali appartenenti ai quattro gruppi sono stati spostati nei locali dedicati e mescolati a suini non facenti parte della prova secondo la normale gestione aziendale. Trattamenti, locali di stabulazione, metodiche di allevamento e alimentazione sono stati conformi alle linee guida dell'Unione Europea e identici per tutti i gruppi sperimentali.

Durante la prima settimana post-vaccinazione, i maiali sono stati monitorati ogni giorno per valutare eventuali reazioni avverse alla vaccinazione.

A 4 settimane di età (svezzamento) e al momento della vaccinazione, sono stati eseguiti prelievi ematici da 20 suinetti per ogni gruppo di trattamento. Questi animali sono stati identificati da un ulteriore marca auricolare, di colore diverso. I campioni di sangue sono stati prelevati a distanza di 4 settimane dalla vaccinazione fino alla macellazione. Le stesse procedure sono state applicate nelle

tre repliche successive.

2.1.3. Segni clinici (morbilità) e mortalità

I trattamenti singolarmente effettuati ai suini sono stati registrati ogni giorno ed utilizzati come parametro per la misurazione della morbilità. I suini morti o quelli per cui si è resa indispensabile l'eutanasia per ragioni di benessere, sono stati registrati ogni giorno e sottoposti ad indagini anatomopatologiche.

2.1.4. Peso e incremento ponderale giornaliero

I singoli pesi corporei dei suini arruolati nello studio sono stati misurati il giorno dell'arruolamento, a 12 e 24 settimane di età. L'IPG è stato calcolato sulla base della variazione di peso tra le varie pesate.

2.1.5. Lesioni macroscopiche e istopatologia

L'obiettivo degli studi patologici è stato quello di stabilire la diagnosi di PCV-SD in tutti i suini morti naturalmente o mediante eutanasia. L'esame necroscopico è stato svolto entro 24 ore dalla morte dei suini.

I campioni di linfonodi inguinali, mesenterici e mediastinici sono stati prelevati e fissati in formalina tamponata al 10%. I campioni fissati sono stati trattati per eseguire delle sezioni di 5 micron le quali sono state colorate con ematossilina-eosina ed esaminate per individuare lesioni compatibili con PCV-SD. La diagnosi di PCVD-SD è stata effettuata quando tutti i tre criteri della definizione internazionale di caso individuale di malattia (segni clinici, lesioni linfoidi da moderate a gravi, quantità di PCV-2 nelle lesioni da moderate a elevate) sono stati rispettati. La quantità di PCV-2 nei campioni di tessuto è stata valutata mediante PCR quantitativa real-time (RT qPCR) secondo Olvera e colleghi (2004).

2.1.6. Estrazione del DNA e qPCR per individuare l'acido nucleico di PCV-2 nei tessuti e nei campioni di siero

Al fine di individuare e quantificare il DNA virale mediante qPCR, il DNA è stato dapprima estratto da 200 µl di siero e 200 µl di omogenato di tessuto linfoide in PBS 1:10,

utilizzando Trizol LS (Invitrogen-San Diego, CA-USA) secondo le istruzioni del produttore.

Il DNA ottenuto è stato sospeso in 50 µl di acqua trattata con DEPC. La qPCR è stata effettuata utilizzando un termo-ciclatore LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics-Basilea, CH).

La Real-time qPCR è stata effettuata utilizzando primer e sonde secondo Olvera e colleghi (2004). I risultati della qPCR sono stati espressi come numero di copie di genoma di PCV-2 per millilitro di siero o grammo di tessuto.

2.1.7. Sierologia

2.1.7.1. Individuazione di anticorpi anti-PCV-2

Per la rilevazione degli anticorpi specifici per PCV-2, è stato utilizzato un kit ELISA indiretto (INGENZIM CIRCO - INGENASA, Madrid, Spagna) disponibile in commercio in base alle istruzioni del produttore. Il titolo di ciascun campione è stato calcolato come segue: $\text{titolo} = 53 (e^{3.2X})$ dove “e” è la base dei logaritmi naturali ed “x” è il rapporto S/P del campione ($S/P = OD \text{ campione} / OD \text{ controllo positivo}$; OD: densità ottica).

2.1.7.2. Analisi retrospettiva delle variazioni anticorpali per PCV-2 dopo il raggruppamento degli animali secondo i livelli di anticorpi di origine materna alla vaccinazione

Gli animali delle tre repliche sono stati retrospettivamente raggruppati in base al valore del rapporto S/P alla vaccinazione per PCV-2 considerando un valore alto S/P (≥ 1.2) e un valore basso S/P (≤ 0.9) e la viremia per PCV-2.

2.1.7.3. Individuazione di anticorpi verso altre infezioni

Gli anticorpi anti-M. hyopneumoniae sono stati valutati tramite un kit ELISA disponibile in commercio (Herd Check® M. hyopneumoniae, IDEXX Laboratories). La presenza di anticorpi contro la glicoproteina gE di ADV è stata determinata utilizzando un kit ELISA disponibile in commercio [HerdChek® PRV g1 (GE) test kit, IDEXX Laboratories] secondo le istruzioni del produttore. Un kit ELISA commerciale (kitCHEKIT-APP-ApxIV ELISA, IDEXX Laboratories) è stato utilizzato per l'individuazione di anticorpi contro A. pleuropneumoniae, mentre per la valutazione della risposta verso l'influenza suina (SIV) (sottotipi H1N1, H1N2 e H3N2) è stato

utilizzato un test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI), con metodo standard (de Jonget al., 1982). La presenza di anticorpi al PRRSV e il rapporto S/P sono stati determinati utilizzando un kit ELISA disponibile in commercio (HerdChek[®] suine reproductive and respiratory Syndrome Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) secondo le istruzioni del produttore.

La classificazione del campione Herd Check[®] si basa sul rapporto S/P, che è definita come (OD campione - OD controllo negativo) / (OD controllo positivo - OD controllo negativo). Rapporti S/P ≥ 0.4 sono stati considerati positivi.

2.1.8. Quantificazione delle cellule secernenti IFN- γ PCV-2 specifiche (IFN- γ SC)

Le frequenze di cellule secernenti IFN- γ PCV-2 specifiche (IFN- γ SC) nel sangue periferico dei suini sono state determinate secondo Martelli et al. (2011) con minime modifiche. Le cellule mononucleate del sangue (PBMC) sono state isolate in gradiente di densità con soluzione Histopaque-1.077[®] e piastrate alla densità di 4×10^5 cellule/pozzetto in terreno completo RPMI-1640 (cRPMI-1640) addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS) in piastre da 96 pozzetti (MultiScreen[®] HTS-IP, Millipore) dopo incubazione O/N a 4 °C con 5 μ g/ml di anticorpo monoclonale anti-IFN- γ di suino (P2G10, BD, Biosciences, Franklin lakes, NJ - USA) e quindi con cRPMI-1640 + 10% FBS per 2 ore a 37 °C.

Per il richiamo antigenico PCV-2 specifico, è stato utilizzato come stimolo un ceppo di PCV2 di campo (I12 / 11) a 0.1 molteplicità di infezione (MOI), in cRPMI-1640 + 10% FBS, per 20 ore a 37 °C, 5% CO₂.

Successivamente, le piastre sono state incubate per 1 ora a 37 °C con 0,5 μ g/ml di anticorpo anti-IFN- γ di suino biotinilato (P2C11, BD) e quindi con 1: 750 di anticorpo anti-biotina AP-coniugato in PBS + 0,5% BSA. Le piastre sono state infine incubate per 7 minuti con una soluzione di sviluppo contenente BCIP / NBT (BioRad, Hercules, CA - USA) e la reazione è stata bloccata con acqua distillata.

Le frequenze di IFN- γ SC PCV-2 specifiche sono state determinate utilizzando un lettore automatico ELISpot (AID[®] ELISpot Software v.3.5 - AID). Come controllo positivo, 4×10^5 PBMC/pozzetto sono state incubate con PHA (5 μ g/ml); come controllo negativo, 4×10^5 PBMC sono state incubate senza antigene. Per valutare la risposta effettiva, gli spot nei pozzetti dei controlli negativi sono stati sottratti dai rispettivi spot osservati nei pozzetti delle cellule stimulate e la risposta immunitaria cellulare è stata espressa come numero di IFN- γ SC per milione di PBMC (IFN- γ SC / 10^6 PBMC).

2.1.9. Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il sistema V.9.1.3 SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Per tutte le analisi, ogni maiale è stato considerato come singola unità sperimentale. Il livello di significatività (α) è stato fissato a 0,05.

Una analisi di omogeneità basale è stata eseguita per verificare che i gruppi di trattamento siano stati bilanciati per sesso e peso prima dell'inizio della prova. Le differenze tra i gruppi (per IPG, PCV-2 ELISA S/P, IFN- γ SC e carica virale PCV-2 nel siero) ad ogni campionamento sono state confrontate mediante analisi della varianza (ANOVA) per le variabili normalmente distribuite e con un test di Kruskal-Wallis per variabili non normalmente distribuite. Il test chi-quadro è stato utilizzato per valutare le differenze tra i gruppi per quanto riguarda mortalità, numero di animali con una carica virale superiore a 10^6 copie/ml di PCV-2 , e numero di animali per cui si è reso necessario un trattamento individuale.

2.2 RISULTATI

I risultati di questa prova di campo sono descritti per ciascuna delle tre repliche.

2.2.1. Morbilità e mortalità

Morbilità e mortalità dei suini delle tre repliche sono evidenziate nella seguente tabella .

REPLICA		GRUPPO			
		A	B	C	D
MORBILITA'	I	6.2 ^a	5.4 ^a	14.7 ^b	18.9 ^b
	II	22.7 ^a	20.7 ^a	21.3 ^a	22.4 ^a
	III	10.3 ^a	0 ^b	8.3 ^a	18.2 ^c
MORTALITA'	I	svezzamento- 12 settimane di età	3.1 ^a	1.6 ^b	3.1 ^a
		12 settimane - macellazione	3.9 ^a	1.6 ^b	3.1 ^a
	II	svezzamento- 12 settimane di età	5.3 ^a	4.0 ^a	2.7 ^b
		12 settimane - macellazione	2.7 ^a	2.7 ^a	4.0 ^b
	III	svezzamento- 12 settimane di età	5.7 ^a	1.9 ^b	2.0 ^b
		12 settimane - macellazione	14.0 ^a	7.7 ^b	18.0 ^a

Tabella 2. Morbilità (n° di iniezioni parenterali) e mortalità nei 4 gruppi dello studio per ciascuna replica. Gruppo A: suini vaccinati a 4 settimane; gruppo B: suini vaccinati a 6 settimane; gruppo C: suini vaccinati a 8 settimane; gruppo D: suini controllo.

È stata quantificata registrando il numero di singoli trattamenti antimicrobici (iniezioni) effettuati ai suini per tutta la durata dell'esperimento. Nella prima replica la morbilità è stata significativamente maggiore nei gruppi C e D ($p < 0.05$). Nessuno dei segni clinici registrati che hanno reso necessario un trattamento è stato associato a PCVD. Nella seconda replica è stato necessario un elevato numero di trattamenti in tutti i gruppi e non è stata osservata alcuna differenza statistica. Tutti i singoli trattamenti sono stati effettuati nel periodo post-svezzamento in concomitanza con il verificarsi di una grave epidemia di PRRSV con i segni clinici associati. Nella terza replica, la morbilità nel gruppo B è stata significativamente più bassa rispetto agli altri gruppi ($p < 0,05$). In particolare, si segnala che la maggior parte dei singoli trattamenti nei gruppi A, C e D è stata necessaria da 12 settimane di età fino al momento della macellazione. Il gruppo D ha

presentato una percentuale molto alta di suini malati (18%) in concomitanza con l'alta percentuale di animali viremici per PCV-2 e titoli elevati di carica virale. Infatti, la differenza di mortalità tra il gruppo D e gli altri è risultata essere statisticamente significativa.

I soggetti morti naturalmente, mediante eutanasia, e quelli di scarto, sono stati sottoposti ad analisi patologica e virologica per evidenziare o meno la presenza di PCVD. Nessuno dei maiali esaminati ha soddisfatto i criteri diagnostici per PCVD-SD.

Il tasso di mortalità nella prima replica è stato significativamente più basso negli animali appartenenti al gruppo B (vaccinati a 6 settimane di età) ($p < 0.05$), in entrambi i periodi di osservazione considerati cioè dallo svezzamento a 12 settimane di età e da 12 settimane alla macellazione. Nella seconda replica, la mortalità è stata significativamente più bassa nel gruppo C nel primo periodo. Al contrario, nel periodo di ingrasso (da 12 settimane alla macellazione), i gruppi A e B hanno mostrato una minore mortalità rispetto agli altri gruppi. Nessuno dei casi di mortalità ha soddisfatto i criteri diagnostici per PCVD. Nell'ultima replica, la mortalità è stata significativamente più bassa nei gruppi B e C fino a 12 settimane, mentre nel gruppo B da 12 settimane di età alla macellazione. La mortalità più elevata nel gruppo D è stata associata a viremia da PCV-2.

2.2.2. Incremento ponderale giornaliero (IPG)

L'IPG è considerato un parametro utile per misurare l'effetto delle PCVD sia nelle forme cliniche che in quelle subcliniche. La tabella mostra l' IPG degli animali vaccinati e dei gruppi di controllo non dimostratosi significativamente differente in qualsiasi periodo nelle tre repliche considerate.

REPLICA		GRUPPO				
		A	B	C	D	
IPG	I	Svezzamento - 12 settimane di età	317±78	303±92	310±69	325±71
		12 settimane - 24 settimane di età	681±129	649±131	633±98	683±132
	II	Svezzamento - 12 settimane di età	244±92	308±72	255±83	304±75
		12 settimane - 24 settimane di età	613±97	683±115	623±125	696±104
	III	Svezzamento - 12 settimane di età	391±72	410±89	420±91	363±88
		12 settimane - 24 settimane di età	741±110	740±107	704±124	730±121

Tabella 3. Incremento ponderale giornaliero, grammi/giorno.

IPG nei 4 gruppi di ogni replica. Gruppo A: suini vaccinati a 4 settimane; gruppo B: suini vaccinati a 6 settimane; gruppo C: suini vaccinati a 8 settimane; gruppo D: suini controllo

2.2.3. Viremia da PCV-2

L'andamento della viremia da PCV-2 nelle tre repliche è evidenziata nella tabella 4.

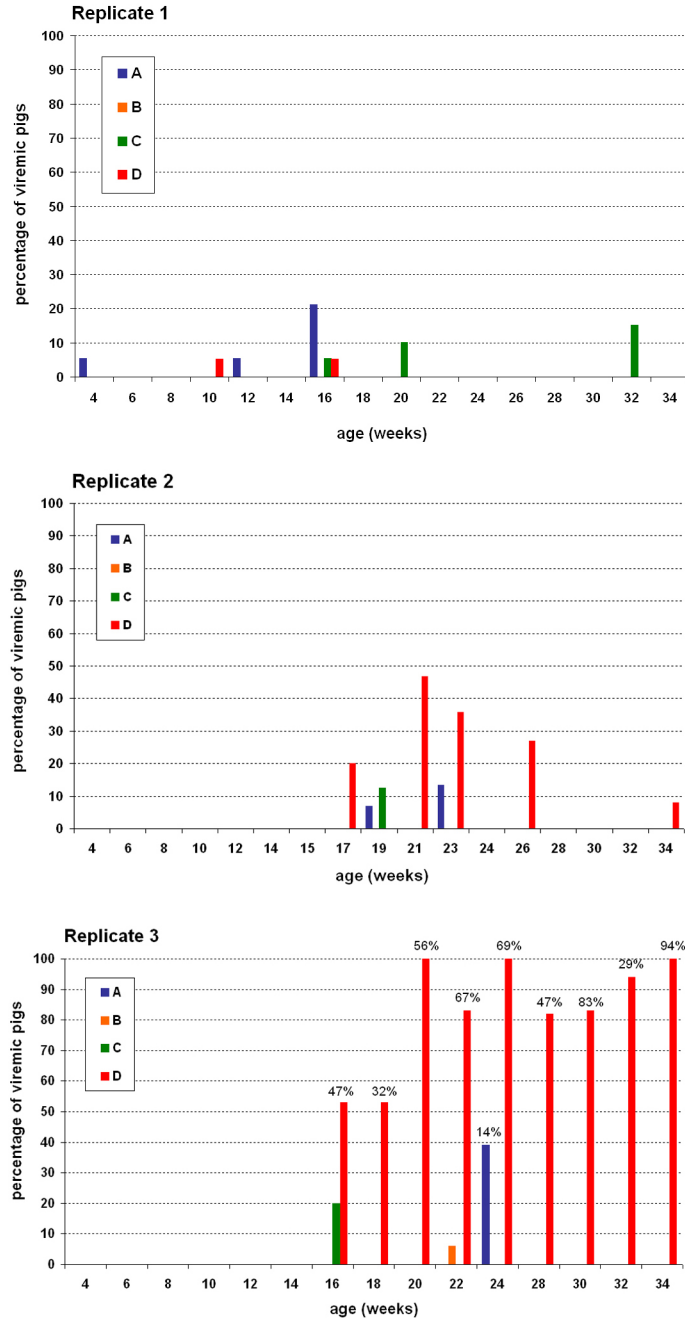


Tabella 4 . Andamento della viremia nei quattro gruppi studio di ogni replica. Gruppo A: suini vaccinati a 4 settimane; gruppo B: suini vaccinati a 6 settimane; gruppo C: suini vaccinati a 8 settimane; gruppo D: suini controllo. I dati sono espressi come percentuale di maiali positivi a PCV2 ($> 10^4$ copie di DNA /ml di siero). I valori in percentuale nella terza replica indicano la percentuale di suini aventi valori $\geq 10^6$ copie di PCV2 DNA /ml di siero sulla percentuale di suini positivi).

Nella prima replica la viremia è stata rilevata in alcuni suini di tutti i gruppi (dal 5% al 25%) a partire da 16 a 20 settimane di età. La carica virale è sempre stata $< 10^6$ copie genoma PCV-2 / ml di siero. Nella seconda replica, da 17 a 23 settimane di età, i gruppi A, C e D hanno presentato

differenti valori di suini viremici: circa il 13% nei gruppi A e C e dal 26,7 al 46,7% nel gruppo D (controllo). La carica virale di questi animali è sempre stata inferiore a 10^6 copie di genoma PCV-2 per ml di siero. Nell'ultima replica, la viremia è stata rilevata nel gruppo D da 16 settimane di età (50% di positività) alla fine dell'esperimento con valori da 80% a 100%. L'alta percentuale di viremia è stata associata ad un carico virale $> 10^6$ copie di genoma PCV-2 per ml di siero in almeno un campionamento per suino durante tutto il periodo di positività. I dati indicano chiaramente che la vaccinazione contro PCV-2 in età diverse induce una riduzione statisticamente significativa della percentuale di animali viremici e della carica virale nel sangue rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$).

2.2.4. Sierologia

2.2.4.1. Risposta sierologica alla vaccinazione ed infezione naturale da PCV-2

Le variazioni sierologiche per quanto riguarda PCV-2 nelle tre repliche è evidenziata nella tabella 5.

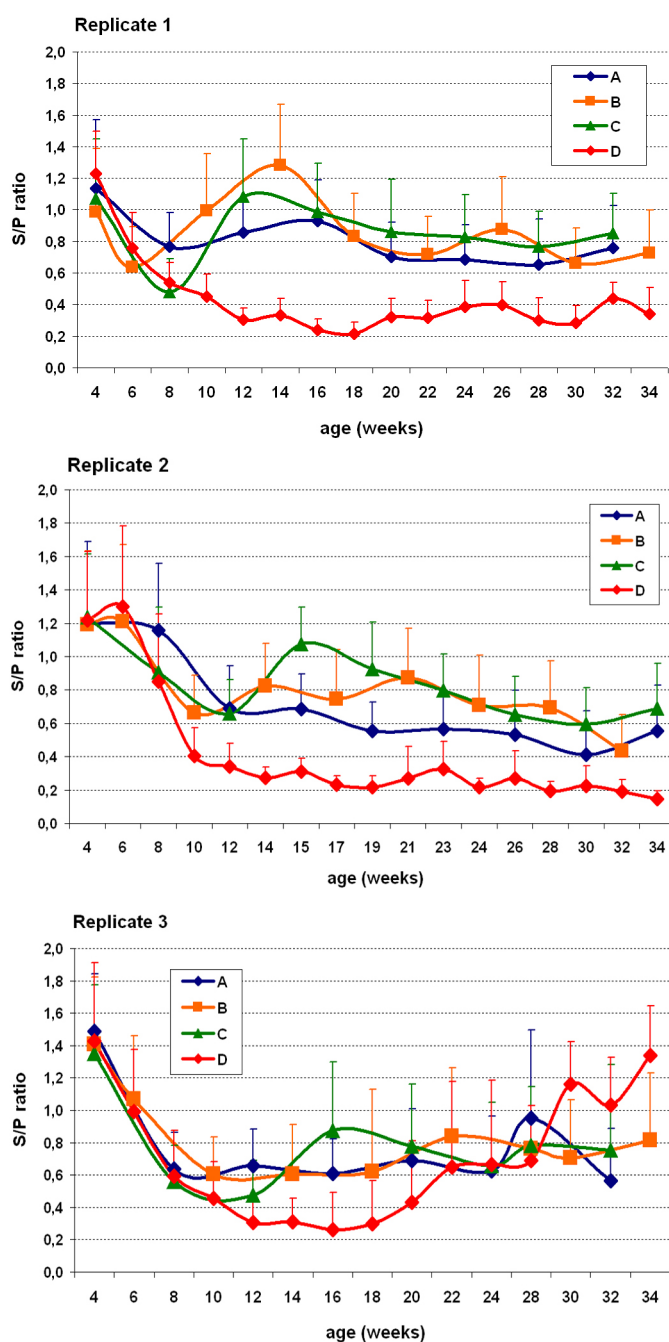


Tabella 5. Variazione della risposta sierologica aPCV2 (anticorpi ELISA anti-PCV2) nei quattro gruppi di studio per ogni replica. Gruppo A: suini vaccinati a 4 settimane; gruppo B: suini vaccinati a 6 settimane; gruppo C: suini vaccinati a 8 settimane; gruppo D: suini controllo.

Nella prima replica i gruppi B e C hanno mostrato un aumento del rapporto S/P dopo la vaccinazione. Nel gruppo A, il titolo anticorpale è stato caratterizzato da un calo nelle prime quattro settimane post-vaccinazione, seguito da un ulteriore lieve aumento. Il gruppo D, non vaccinato, ha subito un calo dell'immunità passiva che ha raggiunto valori del rapporto S/P al di sotto della soglia (0,4) a 10-12 settimane di età. Nella seconda replica, nessun aumento dei valori del rapporto S/P è stato registrato in nessun gruppo dopo la vaccinazione. Da 12 settimane di età in poi, tutti i gruppi vaccinati hanno avuto valori del rapporto S/P significativamente più elevati rispetto al gruppo controllo (gruppo D). Lo stesso livello anticorpale nei suini vaccinati è stato osservato nella terza replica. Infatti, i valori del rapporto S/P negli animali vaccinati non sono aumentati dopo la vaccinazione e si sono mantenuti ad un livello stabilmente sopra la soglia di positività. È interessante notare la sierconversione dei suini del gruppo di controllo a seguito dell'infezione naturale. Al contrario, gli animali vaccinati (tutti i gruppi) hanno mantenuto livelli anticorpali stabili (da 0,6 a 1,0) che hanno protetto efficacemente dalla viremia.

2.2.4.2. Analisi retrospettiva delle variazioni dei livelli anticorpali per PCV-2 dopo il raggruppamento degli animali secondo i titoli anticorpali di origine materna al momento della vaccinazione

I valori del rapporto S/P alla vaccinazione per PCV-2 sono stati raggruppati secondo un valore elevato (≥ 1.2) e un valore basso S/P (≤ 0.9) e sono stati presentati inoltre in base alla rilevazione (o meno) dell'infezione da PCV-2 in termini di viremia (tabella 6).

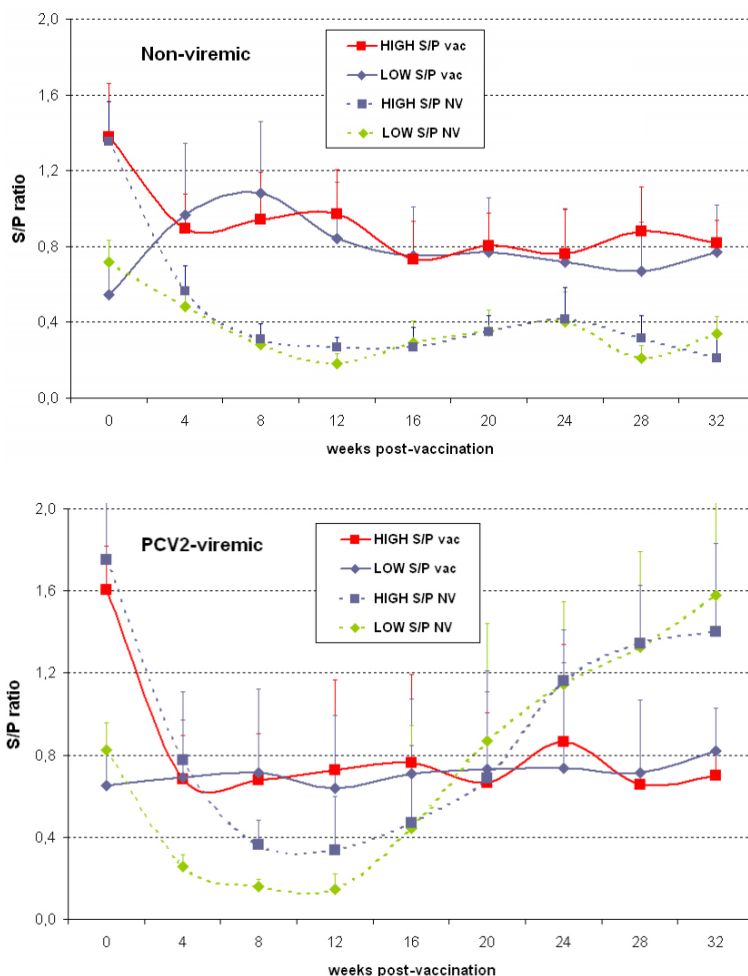


Tabella 6. Variazione della risposta anticorpale (anti-PCV2 ELISA antibodies) secondo i livelli di immunità materna alla vaccinazione e all'infezione a partire da 20 settimane di età. I suini della terza replica sono stati divisi in base al basso (≤ 0.9) o all'elevato (≥ 1.2) valore S/P sia negli animali vaccinati ("HIGH S/P vac" and "LOW S/P vac") che in quelli non vaccinati ("HIGH S/P NV" and "LOW S/P NV").

Gli animali con un elevato valore del rapporto S/P a causa dell'immunità materna, sia vaccinati che non, hanno avuto un uguale diminuzione del titolo anticorpale per PCV-2. Negli animali vaccinati, dopo 4 settimane, la diminuzione si è fermata ed è rimasta stabile per tutta la restante durata dello studio. Al contrario, negli animali non vaccinati ad alto valore S/P, il calo è stato evidente a 12 settimane, raggiungendo valori inferiori alla soglia di sieropositività (< 0.4). La sieroconversione è

stata rilevata a 20 settimane di età, quando si è verificata l'infezione da PCV-2 .

Gli animali con basso rapporto S/P alla vaccinazione non hanno mostrato un calo dei livelli anticorpali che si sono mantenuti stabili e non sono risultati significativamente differenti rispetto ai livelli nei suini vaccinati con alti valori di S/P. Nel gruppo non vaccinato con un basso valore del rapporto S/P, i livelli anticorpali sono diminuiti rapidamente, raggiungendo un valore negativo 4 settimane dopo l'inclusione nel gruppo.

Analogamente al gruppo non vaccinato con alto valore del rapporto S/P, i suini viremici di questo gruppo hanno presentato sierconversione dopo l'infezione.

I livelli anticorpali nei gruppi non vaccinati sono diminuiti e si sono mantenuti a valori inferiori alla soglia di positività per tutta la durata dello studio. Al contrario, la vaccinazione negli animali con alti valori del rapporto S/P non ha indotto sierconversione, ma solo un calo seguito da mantenimento di valori stabili. Negli animali con bassi valori del rapporto S/P, i livelli anticorpali sono stati caratterizzati da una marcata sierconversione e i valori mostrati per tutta la durata della prova sono stati diversi rispetto a quelli degli animali con alti valori alla vaccinazione.

2.2.4.3. Risposta sierologica ad altre infezioni

Le indagini sierologiche effettuate per monitorare le infezioni più frequenti in allevamento (PRRSV e *M. hyopneumoniae*) hanno mostrato che la prevalenza dell'infezione da PRRSV è stata del 100% a 12-15 settimane di età in tutti i gruppi e in tutte le repliche.

Contemporaneamente è stata osservata anche la sierconversione per *M. hyopneumoniae*. Per quest'ultimo antigene, la sieroprevalenza ha continuato ad aumentare nel periodo successivo in tutte le repliche.

Bassi titoli anticorpali per il virus dell'Influenza Suina sono stati rilevati in alcuni campioni . Gli anticorpi per la Malattia di Aujeszky non sono stati rilevati in nessun campione.

2.2.5 Risposta immunitaria cellulo-mediata alla vaccinazione e infezione naturale da PCV-2

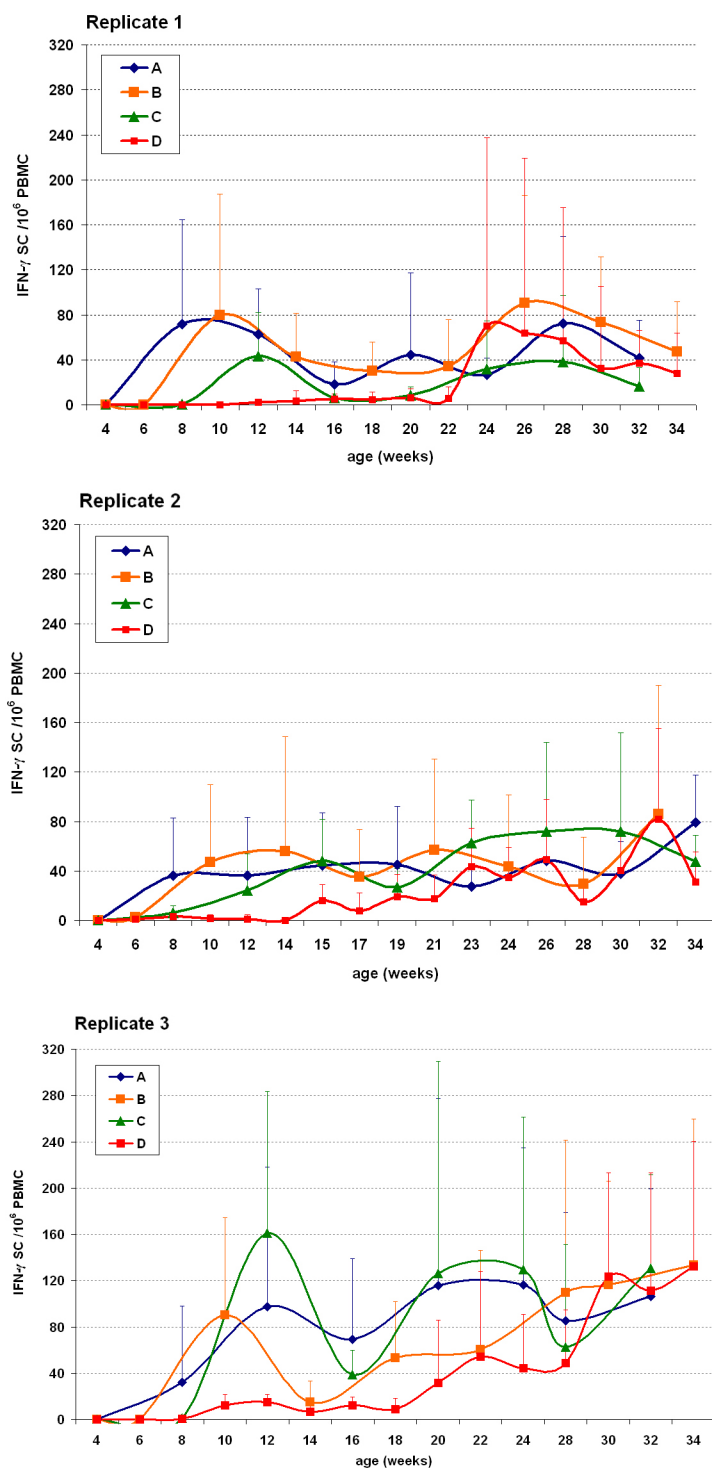


Tabella 7. Variazione delle frequenze delle specifiche IFN- γ SC nei 4 gruppi in esame (vaccinati e non) per ogni replica. Gruppo A: suini vaccinati a 4 settimane; gruppo B: suini vaccinati a 6 settimane; gruppo C: suini vaccinati a 8 settimane; gruppo D: suini controllo.

Nella prima e nella seconda replica, in tutti i gruppi vaccinati è stato osservato un aumento dei livelli di IFN- γ SC PCV-2 specifiche dopo la vaccinazione a prescindere dal momento

della vaccinazione stessa (4, 6 o 8 settimane di età). Per tutta la durata dello studio, le frequenze di IFN γ -SC sono rimaste stabili con alcune variazioni non statisticamente significative. Gli animali del gruppo di controllo (gruppo D) hanno evidenziato un aumento in concomitanza all' infezione da PCV-2 in alcuni animali. In particolare, nella seconda replica, i valori di IFN- γ SC sono stati inferiori rispetto a quelli registrati nella prima replica. Nella terza replica, l'aumento post-vaccinazione delle frequenze di IFN γ SC è stato più intenso rispetto alle precedenti repliche. Inoltre, le IFN γ SC hanno mantenuto livelli elevati durante l'intero periodo di infezione in concomitanza con l'inizio e l'aumento della risposta nel gruppo di controllo (gruppo D) tra 20-22 e 34 settimane di età .

2.3 DISCUSSIONE

Il presente studio è finalizzato a valutare l'efficacia e la risposta immunitaria indotte da un vaccino a subunità per PCV2 somministrato a età diverse (4, 6 o 8 settimane di età) in suini con livelli di immunità materna elevati ed omogenei in quanto derivati da madri (scrofette e scrofe) vaccinate ripetutamente. Tale studio ha pertanto consentito di valutare un timing di vaccinazione dei suinetti ritardato rispetto a quanto comunemente applicato (vaccinazione a 3 settimane di età), al fine di verificare la possibilità di ottimizzazione la vaccinazione anche in relazione ai livelli immunitari passivamente acquisiti. Per valutare gli effetti della vaccinazione sono stati considerati gli eventi clinici, patologici e virologici nonché alcuni aspetti della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata. Durante lo studio, la comparsa dei segni clinici legati alla PCVD-SD non si è verificata nelle prime due repliche come dimostra la risposta immunitaria a PCV2 relativamente bassa o assente nei suini non vaccinati. Nella terza replica, PCV2 mediate PCR dal sangue e morbidità sono stati rilevati nei controlli non vaccinati a partire dalle 16 settimane di età fino alla fine del periodo di osservazione, deponendo per l'avvenuto challenge naturale.

La vaccinazione con una singola dose di vaccino somministrata per via intramuscolare a 3 settimane di età ha costantemente ridotto i segni clinici attribuiti a PCVD così come la mortalità e la viremia da PCV2 (Fort et al, 2009a; Martelli et al, 2011, 2013; Fraile et al., 2012).

Complessivamente, nelle tre repliche, è stato confermato che, negli animali vaccinati, la mortalità in concomitanza con l'infezione da PCV2 si è ridotta e che le differenze statisticamente significative sono state osservate nei soggetti vaccinati a 6 settimane di età. Per misurare la morbidità è stato registrato il numero di trattamenti individuali in tutti i gruppi. Dopo infezione naturale (terza replica), la morbidità è stata significativamente maggiore nel gruppo non vaccinato (controllo) rispetto agli altri gruppi. Inoltre, il gruppo B, che includeva animali vaccinati a 6 settimane, ha

mostrato i risultati significativamente migliori, segnatamente una morbilità inferiore non solo rispetto i controlli-non vaccinati ma anche i vaccinati a 4 (gruppo A) e 8 settimane (gruppo C). Anche l'incremento ponderale giornaliero (IPG) è stato considerato come parametro di efficacia per il protocollo di vaccinazione in esame. Sia prima della comparsa della viremia che della malattia associata (da 4 a 12 settimane di età), e da 12 a 24 settimane (periodo in cui si è verificata la viremia da PCV2 nella terza replica), l'IPG non è risultato essere influenzato positivamente dalla vaccinazione. Questo risultato non è in accordo con studi precedenti (Fachinger et al, 2008;. Horlen et al, 2008;. Kixmoller et al, 2008;. Segales et al, 2009;. Martelli et al., 2011), che sostengono un effetto positivo della vaccinazione su questo parametro. In questo studio, l'impossibilità di rilevare l'eventuale, attesa influenza della vaccinazione sulle prestazioni produttive degli animali vaccinati rispetto ai controlli può essere attribuita al fatto che la determinazione del peso corporeo a 24 settimane di età è stata effettuata precocemente rispetto all'instaurarsi della viremia, rilevata ben oltre questa età, sino alla fine dello studio. In questo modo, stando a quanto segnalato in letteratura, gli animali controllo avrebbero evidenziato gli effetti negativi della viremia da PCV2 sulla performance produttiva dopo l'ultima pesata prevista dal protocollo sperimentale (24 settimane). Tale scelta si è basata su una previsione di durata della viremia più contenuta, segnatamente 4-8 settimane con comparsa ipotizzata a 16-18 settimane di età.

Questi risultati evidenziano che l'infezione da PCV2 può verificarsi fino al tardo periodo di ingrasso e, in particolare, che la viremia può persistere per un lungo periodo, anche superiore a quanto comunemente atteso, fino al momento della macellazione.

Il miglioramento dei parametri clinici (morbilità e mortalità) è associato ad una significativa riduzione della percentuale di suini infetti nonché dei livelli quantitativi di virus nel sangue (viremia). In particolare, nella terza replica, in cui si è verificato il "challenge naturale" (da 16 settimane di età in poi), un elevato numero di suini di controllo ha mostrato una carica virale elevata nel siero ($>10^6$ copie di DNA/ml) a chiara dimostrazione di una infezione in grado di sostenere, almeno potenzialmente e sulla base della letteratura, le manifestazioni cliniche da PCV-SD. Tale evento è stato peraltro osservato, come si evince dalla maggiore morbilità registrata nel gruppo controllo. Al contrario, nei suini vaccinati, non solo la percentuale di animali positivi al virus è risultata minore, ma anche la durata della viremia e la carica virale sono state notevolmente inferiori se non trascurabili, come evidenziato nel gruppo B. Nella prima replica, la viremia è stata rilevata sporadicamente con una percentuale bassa e con una breve durata della positività alla PCR. Nella seconda replica, solo il 13% degli animali vaccinati sono risultati PCR-positivi per PCV2 con una carica virale inferiore a 10^6 copie di DNA/ml, e durata limitata ad un paio di settimane. I controlli hanno avuto una viremia superiore sia in termini di percentuale di suini positivi che di durata.

È da notare, inoltre, che l'infezione da PCV2 può essere assente o molto limitata per un certo periodo di tempo, come osservato nel caso delle prime due repliche, per poi riapparire senza alcun motivo apparente e prevedibile. Questo aspetto merita ulteriori studi.

Tutti gli animali sono risultati PCV2-negativi mediante PCR al momento della vaccinazione a confermare l'effettiva origine materna degli anticorpi anche nei suini vaccinati a 8 settimane di età. In generale, il valore di S/P nei suinetti a 4 settimane di età è aumentato nelle tre successive repliche in conseguenza dell'effetto della vaccinazione ripetuta sulle scrofe al momento della fecondazione. Così, nella prima replica, anche se i rapporti S/P sono inferiori rispetto a quelle successive, non si è rilevata sieroconversione nei suinetti vaccinati a 4 settimane a causa dell'immunità materna trasmessa per via colostrale. Questo risultato è in accordo con uno studio precedente (Martelli et al., 2011). Al contrario, la sieroconversione è stata rilevata negli animali vaccinati a 6 e 8 settimane di età (gruppo B e C, rispettivamente), come diretta conseguenza del declino dell'immunità materna che si è verificata entro 2-4 settimane. Nella 2^a e 3^a replica questa riduzione di anticorpi di derivazione materna è stata ritardata a causa del livello più elevato del rapporto S/P a 4 settimane di età. Tuttavia, a seguito della vaccinazione, anche nei casi in cui non si è verificata la sieroconversione, i livelli di S/P non hanno seguito un declino verso la negatività sierologica ma si sono mantenuti al di sopra della soglia di positività ($S/P > 0,4$) per tutta la durata dello studio, con valori comunque utili ai fini della protezione. Nei controlli, al contrario, i valori di S/P espressione dell'immunità materna passivamente acquisita hanno seguito un andamento costantemente in declino raggiungendo valori decisamente negativi ($S/P < 0,4$) attorno alle 10 settimane di età, rendendo gli animali suscettibili in quanto privi di alcuna protezione umorale e tanto meno cellulare. Queste evidenze confermano quindi che l'immunità umorale indotta dalla vaccinazione in singola dose induce livelli anticorpali stabili e duraturi che hanno come risultato la protezione clinica, indipendentemente dai livelli di immunità materna, anche quando non viene evidenziata sieroconversione.

L'analisi retrospettiva dei livelli anticorpali per PCV2 dopo il raggruppamento degli animali in base ai livelli anticorpali (alti o bassi) di origine materna misurati come rapporti S/P alla vaccinazione evidenzia che gli animali con alti valori S/P non sieroconvertono mentre ciò si realizza chiaramente nei soggetti con bassi valori. È interessante notare che l'andamento dei rapporti S/P per tutta la durata dello studio è mantenuto a livelli stabili e senza differenze nei valori assoluti tra i due gruppi (alti valori S/P vs. bassi valori S/P). Inoltre, gli animali non vaccinati, sia con alta che con bassa immunità materna, evidenziano una diminuzione della stessa che raggiunge valori negativi nel secondo mese di vita. Gli animali non vaccinati raggruppati secondo la presenza di PCV2 manifestano l'attesa sieroconversione subito dopo la viremia.

Sia i suini vaccinati che hanno sieroconvertito avendo dei bassi livelli di immunità materna sia quelli che non hanno sieroconvertito (alti livelli di anticorpi passivi), hanno mantenuto valori protettivi stabili ed efficienti di anticorpi per l'intero ciclo di produzione, anche quando si è verificata l'infezione naturale da 16 settimane di età in poi. Questi risultati indicano chiaramente che il grado di protezione non è maggiore negli animali con basso valore S/P alla vaccinazione rispetto a quelli con valori elevati; confermano inoltre che titoli elevati di immunità materna non interferiscono con l'effetto di una singola dose del vaccino in esame (Fort et al, 2008, 2009b; Opriessnig et al, 2008a; Martelli et al, 2011) e che il vaccino è idoneo all'immunizzazione dei suinetti anche qualora presentino elevati livelli di immunità materna conferendo una protezione clinica duratura anche in caso di infezione tardiva (≥ 4 -5 mesi di età).

Alcuni studi hanno esaminato l'influenza dell'età sull'efficacia della vaccinazione per PCV2 in singola dose in suinetti con alti livelli di anticorpi di origine materna. Uno di questi ha valutato l'efficacia della vaccinazione a una settimana e tre settimane di età in condizioni di campo (Haake et al., 2014). Analogamente a quest'ultimo studio, sono stati rilevati valori significativi di anticorpi materni nei suinetti con livello crescente proporzionalmente al numero di vaccinazioni subite dalle scrofe.

Uno studio precedente (Martelli et al., 2011) ha dimostrato che l'efficacia del vaccino in esame è contemporaneamente sostenuta dallo sviluppo della risposta immunitaria cellulare e questo è confermato dall'aumento dei livelli di IFN- γ SC nei suini dopo la vaccinazione. La capacità del vaccino di indurre immunità cellulare, non è influenzata negativamente dalla presenza di alti valori di immunità materna (Endsley et al, 2003; Pomorska-Mòl e Markowska-Daniel, 2010; Pomorska-Mòl et al., 2012; Bandrick et al, 2014). I dati del presente studio confermano che l'immunità cellulo-mediata verso PCV2 misurata come numero di cellule secernenti IFN- γ è stata indotta entro 4 settimane dalla vaccinazione in tutte le repliche e tutti i gruppi vaccinati. I livelli di IFN- γ SC si sono mantenuti stabili durante lo studio (34 settimane di età) e sono stati ai massimi livelli anche durante il periodo di infezione tardiva, verificatosi nella terza replica.

3 - CONCLUSIONI

In conclusione, il presente studio dimostra l'effetto protettivo della vaccinazione con una singola dose di un vaccino per PCV2 anche in presenza di elevati livelli di immunità materna al momento della somministrazione, in particolare quando gli animali vengono esposti ad infezione naturale da PCV2.

Gli effetti della vaccinazione a differenti età sono strettamente associati alla protezione clinica e virologica grazie all'elevata immunogenicità del vaccino misurata come attivazione umorale e cellulare. Inoltre, viene dimostrato che, anche in condizioni di elevati livelli di immunità materna, i suinetti vaccinati a 4, 6 o 8 settimane di età hanno una risposta immunitaria protettiva caratterizzata da immunità cellulare e da una stabile e duratura (fino 34 settimane di età) risposta anticorpale. Infine, lo studio dimostra che l'efficacia della vaccinazione nei suinetti viene conservata anche quando il vaccino viene somministrato più tardivamente rispetto alla “canonica” età di 3 settimane; infatti, la combinazione di dati immunologici e dei risultati clinici indicano chiaramente che la vaccinazione a 6 settimane di età può essere applicata con successo anche in condizioni di campo.

4 - BIBLIOGRAFIA

1. Allan, G., Krakowka, S, Ellis, J., 2002. PCV2: ticking time bomb. *Pig Progress*, 18, 14–15.
2. Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3–14.
3. 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, 3–10.
4. Allan, G.M., McNeilly, F., Meehan, B.M., Kennedy, S., Mackie, D.P., Ellis, J.A., et al., 1999. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* 66, 115-123.
5. Bandrick, M., Theis, K., Molitor, TW., 2014. Maternal immunity enhances *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination induced cell-mediated immune responses in piglets. *BMC Vet. Res.* 10:124.
6. Bassaganya-Riera, J., Pogranichniy, R.M., Jobgen, S.C., Halbur, P.G., Yoon, K.J., O'Shea, M., Mohede, I., Hontecillas, R., 2003. Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression. *J. Nut.* 133, 3204–3214.
7. Calsamiglia, M., Segalés, J., Quintana, J., Rosell, C., Domingo, M., 2002. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin. Microbiol.* 40, 1848–1850.
8. Chae, C., 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.* 168, 41-49.
9. Cheung, A.K., 2003. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology* 313, 452–459.
10. Clark, E., 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: *Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners*, pp. 19–20.
11. Clark, E., 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners*, pp. 499–501.

12. Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, B., Magar, R., 2003. Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet. Pathol.* 40, 143–148.
13. Drolet, R., Thibault, S., D’Allaire, S., Thomson, J.R., Done, S.H., 1999. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *J. Swine Health Prod.* 7, 283–285.
14. Endsley, J.J., Roth, J.A., Ridpath, J., Neill, J., 2003. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals* 31, 123-125.
15. Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S.B., Saalmuller, A., Elbers, K., 2008. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* 26, 1488-1499.
16. Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weaning pigs. *J. Virol.* 77, 11232–11243.
17. Ferrari, L., Borghetti, P., De Angelis, E., Martelli, P. 2014. Memory T cell proliferative responses and IFN- γ productivity sustain long-lasting efficacy of a Cap-based PCV2 vaccine upon PCV2 natural infection and associated disease. *Vet. Res.* 45, 44.
18. Ferreira, D., Sansot, B., Laval, A., 2001. Attempt to use serotherapy to control mortality in PMWS. In: *Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting*, p. 144.
19. Fort, M., Fernandes, L.T., Nofrarias, M., Díaz, I., Sibila, M., Pujols, J., et al., 2009b. Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 129, 101-107.
20. Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F., Segales, J., 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 26, 1063-1071.

21. Fort, M., Sibila, M., Pérez-Martín, E., Nofrías, M., Mateu, E., Segalés, J., 2009a. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine* 27, 4031-4037.
22. Grau-Roma, L., Fraile, L., Segalés, J., 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. J.* 187, 23-32.
23. Grau-Roma, L., Hjulsgaard, C.K., Sibila, M., Kristensen, C.S., Lopez-Soria, S., Enøe, C., et al., 2009. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet. Microbiol.* 135, 272-282.
24. Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P.S., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72, 5262–5267.
25. Harding, J.C., 1996. Postweaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. In: *Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners*, p. 21.
26. Harding, J.C., 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet. Microbiol.* 98, 131–135.
27. Harding, J.C.S., Clark, E.G., 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Swine Health Prod.* 5, 201–203.
28. Hélie, P., Drolet, R., Germain, M.C., Bourgault, A., 1995. Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. *Can. Vet. J.* 36, 150–154.
29. Horlen, K.P., Dritz, S.S., Nietfeld, J.C., Henry, S.C., Hesse, R.A., Oberst, R., et al., 2008. A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232, 906-912.

30. Kixmoller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmuller, A., Elbers, K., Fachinger, V., 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 26, 3443-3451.
31. 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, 8262–8274.
32. Martelli, P., Ferrari, L., Morganti, M., De Angelis, E., Bonilauri, P., Guazzetti, S., et al., 2011. One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *Vet. Microbiol.* 149, 339-351.
33. Martelli, P., Gozio, S., Ferrari, L., Rosina, S., DeAngelis, E., Quintavalla, C., et al., 2009. Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: clinical protection and cell-mediated immunity. *Vaccine* 27, 3788-3799.
34. Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Bøtner, A., Kristensen, C.S., Nauwynck, H.J., 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet. Res.* 2:6.
35. Nawagitgul, P., Harms, P.A., Morozov, I., Thacker, B.J., Sorden, S.D., Lekcharoensuk, C., et al., 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 33-40.
36. 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.

37. Oh, Y., Seo H.W., Han K., Park C., Chae, C., 2012. Protective effect of the maternally derived porcine circovirus type 2 (PCV2)-specific cellular immune response in piglets by dam vaccination against PCV2 challenge. *J. Gen. Virol.* 93, 1556-1562.
38. 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.
39. Opriessnig, T., Madson, D.M., Prickett, J.R., Kuhar, D., Lunney, J.K., Elsener, J., et al., 2008b. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Vet. Microbiol.* 131, 103-114.
40. 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.
41. Opriessnig, T., Patterson, A.R., Elsener, J., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2008a. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 397-401.
42. Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Halbur, P.G., 2009. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination. *Vaccine* 27, 1002-1007.
43. Opriessnig, T., Shen, H.G., Pal, N., Ramamoorthy, S., Huang, Y.W., Lager, K.M., Beach, N.M., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2011. A live-attenuated chimeric porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine is transmitted to contact pigs but is not upregulated by concurrent infection with porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and is efficacious in a PCV2b-PRRSV-PPV challenge model. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 1261-1268.
44. 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, 624-640.
45. Reynaud, G., Beseme, S., Brun, A., Charreyre, C., Desgouilles, S., Jeannin, P., Rehbein, S., 2004. Safety of a high dose administration of an inactivated adjuvanted PCV2 vaccine in conventional gilts. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, p. 87.
46. Reynaud, G., Brun, A., Charreyre, C., Desgouilles, S., Jeannin, P., 2004. Safety of a repeated overdose of an inactivated adjuvanted PCV2 vaccine in conventional pregnant gilts and sows. Proceedings of the 18th Congress of the International Pig Veterinary Society (IPVS), Hamburg, Germany. June 27 - July 2, 88.
47. Rodríguez-Arrioja, G.M., Segalés, J., Balasch, M., Rosell, C., Quinta, J., Folch, J.M., et al., 2000. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 (PCV-1) and type 2 (PCV-2) in pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet. Rec. 146, 762-764.
48. Rosell, C., Segalés, J., Domingo, M., 2000. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. Vet. Pathol. 37, 687-692.
49. Rosell, C., Segalés, J., Plana-Duràn, J., Balasch, M., Rodríguez-Arrioja, 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.
50. Segalés, J., Domingo, M., 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. Vet. Q. 24, 109-124.
51. Segalés J, Rosell C, Domingo M., 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. Vet Microbiol. Feb 4;98:137- 49.
52. Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. Anim. Health. Res. Rev. 6, 119-142.

53. Segalés, J., Domingo, M., Chianini, F., Majo, N., Dominguez, J., *et al.*, 2004. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet. Microbiol.* 98, 151–158.
54. Segalés, J., Piella, J., Marco, E., Mateu-de-Antonio, E.M., Espuna, E., Domingo, M., 1998. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Spain. *Veterinary Record* 142, 483–486.
55. Segalés, J., Urniza, A., Alegre, A., Bru, T., Crisci, E., Nofrarias, M., *et al.*, 2009. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine* 27, 7313-7321.
56. Segalés, J., Urniza, A., Alegre, A., Bru, T., Crisci, E., Nofrarias, M., *et al.*, 2010. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine* 27, 7313-7321.
57. Sorden, S.D., 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 8, 133-136.
58. Steiner, E., Balmelli, C., Gerber, H., Summerfield, A., McCullough, K., 2009. Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Vet. Res.* 5:45.
59. 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.
60. Yu, S., Vincent, A., Opriessnig, T., Carpenter, S., Kitikoon, P., Halbur, P.G., Thacker, E., 2007. Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. *Vet. Microbiol.* 123, 34-42.