

PREVALENZA DI AGENTI EZIOLOGICI IN CASI DI ABORTO IN LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA TRA IL 2017 E IL 2021

PREVALENCE OF ETIOLOGICAL AGENTS IN CASES OF ABORTION IN LOMBARDIA AND EMILIA ROMAGNA REGION BETWEEN 2017 AND 2021

BOSCO C., TORREGGIANI C., PROSPERI A., CHIAPPONI C., FACCINI S., ROSIGNOLI C., PUPILLO G., SALOGNI C., BASSI P., MAISANO A.M., LUPPI A.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
"Bruno Ubertini" (IZSLER)*

Parole chiave: feti, aborto, agenti abortigeni infettivi

Keywords: fetuses, abortion, abortigenic infectious agents

RIASSUNTO

In questo studio sono stati analizzati retrospettivamente i risultati delle indagini di laboratorio svolte a scopo diagnostico presso le Sedi Territoriali della Lombardia e dell'Emilia Romagna dell'IZSLER tra il 2017 e il 2021 su 883 casi di aborto suino. Nel 35,1% dei casi, con l'impiego di metodiche biomolecolari, è stata riscontrata la positività verso almeno uno degli agenti eziologici investigati e sono state riscontrate le seguenti prevalenze: PRRSV (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) (19%), PCV3 (*Porcine circovirus 3*) (18,5%), PCV2 (*Porcine circovirus 2*) (18,3%), *Chlamydia spp.* (4,8%), PPV (*Porcine parvovirus*) (2,8%), *Leptospira spp.* (2,6%). Nel 17,7% dei casi è stato individuato più di un agente eziologico abortigeno. Relativamente ai casi positivi per PCV2, in 20 casi totali la quantità di copie di genoma virale rilevata per grammo di materiale patologico testato mediante PCR quantitativa era maggiore di 10^7 e, nei casi in cui si è proceduto a conferma istopatologica, la diagnosi di aborto sostenuto da PCV2 non è stata confermata.

ABSTRACT

The results of the diagnostic investigations were retrospectively analyzed in 883 cases of swine abortion. The samples analyzed were fetuses collected during the diagnostic activity of IZSLER laboratories located in Lombardia and Emilia Romagna (Italy) between 2017 and 2021. In 35,1% of cases, the results of the different PCR tests performed were positive for at least one of the abortive etiological agents investigated that showed the following prevalences: PRRSV (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) (19%), PCV3 (*Porcine circovirus 3*) (18,5%), PCV2 (*Porcine circovirus 2*) (18,3%), *Chlamydia spp.* (4,8%), PPV (*Porcine parvovirus*) (2,8%), *Leptospira spp.* (2,6%). In 17,7% of the cases, more than 1 abortive etiological agent was identified. As regards PCV2 positive cases, in 20 total cases the quantity of copies of viral DNA, per gram of pathological material tested, detected by quantitative PCR was greater than 10^7 . In cases where histological and immunohistochemical examinations were also performed, the diagnosis of PCV2 abortion was not confirmed.

INTRODUZIONE

Le turbe riproduttive nella scrofa rappresentano un'importante causa di perdite economiche per gli allevamenti suinicoli. Se la morte dell'embrione avviene prima del trentacinquesimo giorno di gestazione si ha il riassorbimento embrionale, successivamente inizia il periodo fetale. Quando

la causa scatenante la patologia riproduttiva insorge precocemente si possono osservare feti mummificati, altrimenti se insorge nel periodo più tardivo della gestazione si possono riscontrare suinetti nati morti, disvitali o parti prematuri. Nel caso in cui vi sia una combinazione di feti mummificati e nati morti di diverse dimensioni, la morte fetale è insorta in diversi momenti della gestazione e questo può essere conseguenza di una progressiva diffusione intrauterina di un agente infettivo (Almond *et al.*, 2006).

Gli agenti eziologici infettivi responsabili di aborto possono essere batterici tra cui *Brucella suis*, *Leptospira spp.*, *Chlamydia spp.*, (Almond *et al.*, 2006) o, virali come PRRSV (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*), PCV2 (*Porcine circovirus 2*), EMCV (*Encephalomyocarditis virus*), ADV (*Aujeszky's disease Virus*), IAV (*Influenza Virus A*) (Saporiti *et al.*, 2021b). Negli ultimi anni, anche il PCV3 (*Porcine circovirus 3*) è stato proposto da diversi autori come potenziale agente eziologico in grado di provocare turbe riproduttive nella scrofa (Saporiti *et al.*, 2021b; Arruda *et al.*, 2019; Palinski *et al.*, 2017). Gli agenti infettivi virali sono la causa più comune di aborto nel suino e, sia in caso di infezione virale, sia in caso di infezione batterica, per poter avere maggiori possibilità di individuare l'agente infettivo causa di aborto, è importante analizzare più feti abortiti per scrofa (Kirkwood *et al.*, 2013). Inoltre, la diagnosi di alcuni di questi agenti eziologici, in particolar modo per quanto riguarda i *Circovirus* PCV2 e PCV3, assume maggiore rilevanza se la presenza del virus nei tessuti accertata mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) viene confermata dalla presenza di lesioni istopatologiche tipiche e dalla positività immunoistochimica nelle cellule target. L'aborto può anche essere conseguente a cause non infettive tra cui vi sono fattori ambientali, individuali della scrofa, alimentari e tossici (Christianson, 1992; Vanderhaeghe *et al.*, 2013).

In questo studio retrospettivo sono stati analizzati i risultati delle indagini di laboratorio eseguite presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) tra il 2017 e il 2021, su feti provenienti da casi di aborto suino verificatisi in allevamenti situati nel territorio di competenza delle due regioni.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nello studio 3635 feti, provenienti da 365 aziende suinicole, conferiti presso le Sedi Territoriali dell'IZSLER tra il 2017 e il 2021 corrispondenti a 883 casi di aborto. Ogni caso di aborto incluso nello studio corrisponde ad un singolo focolaio e i feti provenienti da episodi di aborto verificatisi nel tempo ma all'interno dello stesso focolaio, sono stati considerati come un unico caso. A questo proposito i casi in cui sono stati conferiti più feti in diversi momenti durante lo stesso mese o in due mesi consecutivi, sono stati considerati come un unico caso di aborto, ad eccezione di 18 casi in cui gli esiti degli esami diagnostici indicavano positività nei confronti di agenti eziologici differenti, riconducibili alla presenza di diversi focolai nella stessa azienda.

Trattandosi di uno studio retrospettivo, per ovvi motivi, per ogni caso di aborto non sono state eseguite costantemente le stesse indagini e questo è, nella routine diagnostica, determinato da diversi fattori, come ad esempio la diversa presentazione clinica dei casi sottoposti ad indagini di laboratorio. Di seguito si riporta il numero di casi in cui è stata eseguita l'indagine nei confronti di un determinato agente eziologico, sul totale dei casi inclusi nello studio: PRRSV (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) (862/883), PCV3 (*Porcine circovirus 3*) (205/883), PCV2 (*Porcine circovirus 2*) (663/883), *Chlamydia spp.* (458/883), PPV (*Porcine parvovirus*) (634/883), *Leptospira spp.* (384/883). La prevalenza di ciascun agente infettivo investigato è stata calcolata rapportando il numero di casi positivi con quello dei casi testati.

Biologia molecolare

Gli agenti eziologici indagati mediante la metodica molecolare PCR o Real Time PCR, inclusi nello studio, sono stati: PRRSV, PCV2, PCV3, PPV, *Chlamydia spp.* e *Leptospira spp.* La

ricerca di PCV2 è stata eseguita secondo quanto precedentemente descritto (Opriessnig *et al.*, 2003). I campioni sono stati analizzati per PCV3 mediante Real-Time PCR utilizzando primer precedentemente descritti (Palinski *et al.*, 2017). La ricerca di PRRSV è stata eseguita mediante Real-Time RT-PCR per il gene ORF 7 (*Virotype* PRRS RT-PCR - Kit Indical). Il fegato è stato impiegato per la ricerca di PPV secondo la metodica descritta da Kim *et al.*, 2001 mentre pool di visceri sono stati impiegati per la ricerca di *Chlamydia spp.* e *Leptospira spp.* secondo quanto riportato rispettivamente da Ehricht *et al.* nel 2006 e Bedir *et al.* nel 2010.

Istologia e Immunoistochimica

Campioni di cuore, quando le condizioni di conservazione del materiale patologico lo permettevano, sono stati prelevati e fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati al microtomo a 5 µm di spessore e colorati con ematossilina-eosina secondo metodiche standardizzate. Un'indagine immunoistochimica per PCV2 è stata eseguita su sezioni di miocardio mediante anticorpo monoclonale *home made* (diluito 1:500), impiegando come sistema di rivelazione il Novolik Polymer (Novocastra) e come cromogeno il Novared (Vector).

RISULTATI

Tra il 2017 e il 2021 sono stati analizzati 883 casi di aborto e, dalle indagini molecolari effettuate sui feti suini, il 35,1% del totale dei casi (310/883) è risultato positivo ad almeno uno degli agenti eziologici ricercati. In figura 1 sono stati riportati i casi positivi per anno.

Come si può osservare in tabella 1 l'agente eziologico più frequentemente riscontrato rispetto alla quantità di casi testati è risultato essere PRRSV (19%), seguito da PCV3 (18,5%) e PCV2 (18,3%). Il numero totale di casi testati per ciascun agente eziologico ricercato è variato da un minimo di 205 casi testati per PCV3 ad un massimo di 862 casi testati per PRRSV. In tabella 1 sono riportate le prevalenze di ciascun agente eziologico investigato.

Tabella 1: Numero casi positivi in rapporto ai casi testati per agente eziologico (PRRSV, PCV3, PCV2, *Chlamydia spp.*, *Leptospira spp.*) per anno (2017, 2018, 2019, 2020, 2021). Numero e percentuale casi positivi/casi testati per agente eziologico in totale (dal 2017 al 2021).

Table 1: Positive cases and tested cases per etiological agent (PRRSV, PCV3, PCV2, *Chlamydia spp.*, *Leptospira spp.*) per year (2017, 2018, 2019, 2020, 2021). Number and percentage positive cases/tested cases per etiological agent in total (from 2017 to 2021).

Agenti eziologici	Casi	ANNO					Totale n	Positivi/Testati %
		2017	2018	2019	2020	2021		
PRRSV	Positivi	28	41	32	31	32	164	19,0%
	Testati	160	165	181	182	174	862	-
PCV3	Positivi	8	7	19	3	1	38	18,5%
	Testati	45	43	95	18	4	205	-
PCV2	Positivi	21	21	24	23	32	121	18,3%
	Testati	113	128	140	132	150	663	-
<i>Chlamydia spp.</i>	Positivi	2	4	8	4	4	22	4,8%
	Testati	80	84	99	100	95	458	-
PPV	Positivi	6	0	2	4	6	18	2,8%
	Testati	124	119	135	134	122	634	-
<i>Leptospira spp.</i>	Positivi	1	0	2	4	3	10	2,6%
	Testati	42	76	99	97	70	384	-

Figura 1: Casi positivi ad almeno un agente eziologico e percentuale dei casi positivi sui casi testati per anno dal 2017 al 2021.

Figure 1: Positive cases and percentage of positive cases out of the total tested cases per year from 2017 to 2021.

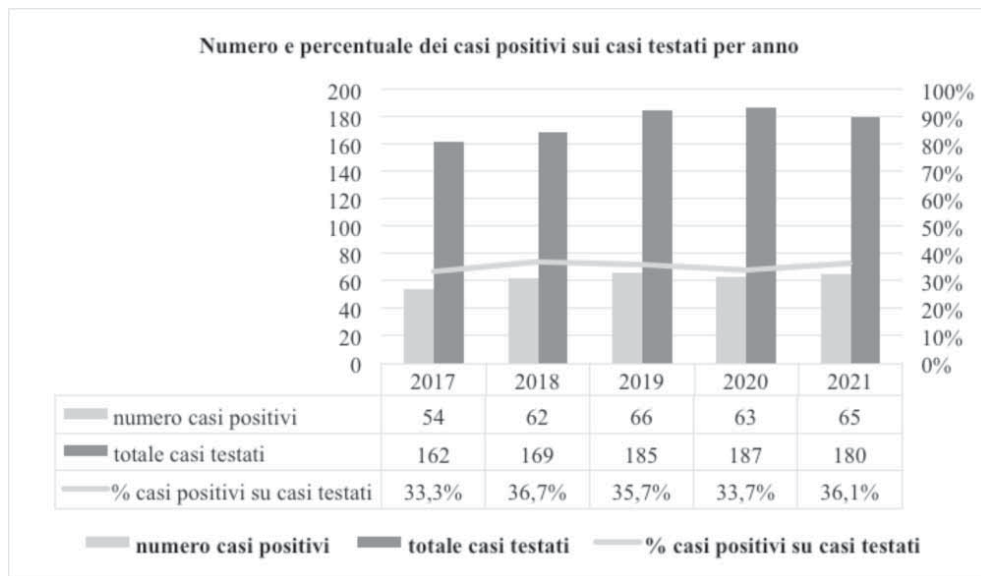


Tabella 2: Esiti di PCR quantitativa per PCV2, per ciascun caso positivo per PCV2, con quantità di copie di genoma virale/grammo $>10^7$ e $<10^7$ per anno dal 2017 al 2021 e in totale (numero e percentuale di casi positivi sul totale).

Table 2: Quantitative PCR for PCV2 of PCV2 positive cases with a quantity of viral DNA copies $>10^7$ and $<10^7$ per year from 2017 to 2021 and in total (number and percentage of positives out of the total).

PCV2: Quantità copie di genoma virale	Quantità copie di genoma virale					Totale	
	2017	2018	2019	2020	2021	n.	%
$>10^7$	3	3	5	3	6	20	16,5%
$<10^7$	18	18	19	20	26	101	83,5%

In 20 dei 121 casi positivi per la presenza di PCV2, la quantità di copie di genoma virale rilevata mediante la PCR quantitativa era maggiore di 10^7 (tab. 2).

Il 17,7% dei 310 casi positivi (55/310) erano positivi per più di un agente eziologico contemporaneamente. Di questi ultimi, 47 erano positivi per 2 agenti eziologici e in 8 casi la positività è stata rilevata verso 3 agenti eziologici. Il 70,9% dei casi (39/55) mostrava positività per PRRSV in associazione ad uno o due altri agenti eziologici, mentre PCV2 era associato ad almeno un altro agente eziologico nel 67,3% dei casi (37/55). Le diverse combinazioni di positività rilevate sono riportate in tabella 3.

Tabella 3: Casi positivi per ogni diversa combinazione dei diversi agenti eziologici investigati.
Table 3: Different combination of etiological agents and related positive cases.

Combinazione agenti eziologici	Casi positivi
PRRSV + PCV2	21
PRRSV + PCV3	6
PRRSV + <i>Chlamydia spp.</i>	5
PCV2 + PCV3	4
PCV3 + <i>Chlamydia spp.</i>	3
PRRSV + PPV	2
PCV2 + <i>Leptospira spp.</i>	2
PRRSV + PCV2 + <i>Chlamydia spp.</i>	2
PCV2 + PCV3 + PPV	2
PCV2 + <i>Chlamydia spp.</i>	1
PCV2 + PPV	1
PCV3 + PPV	1
<i>Leptospira spp.</i> + <i>Chlamydia spp.</i>	1
PRRSV + PCV2 + <i>Leptospira spp.</i>	1
PRRSV + PCV2 + PCV3	1
PRRSV + PCV2 + PPV	1
PCV2 + PCV3 + <i>Chlamydia spp.</i>	1

L'esame istologico è stato effettuato in 13 dei 121 casi di positività per la presenza di PCV2 e in nessun caso è stata confermata la presenza di lesioni istologiche compatibili con una diagnosi di aborto da PCV2.

DISCUSSIONE

Tra il 2017 e il 2021 il 35,1% (310/883) dei casi di aborto analizzati presso le Sedi dell'IZSLER sono risultati positivi per gli agenti infettivi abortigeni investigati. I restanti casi eziologicamente negativi potrebbero essere legati a cause infettive di aborto non indagate o, in maggior misura, a cause di aborto non infettive. Come già osservato da altri autori, una percentuale di aborti superiore al 50% può essere determinata da cause non infettive (Saporiti *et al.*, 2021b; Maldonado *et al.*, 2005). Le cause non infettive di natimortalità (distinguendo se si tratta di fenomeno che si verifica prima del parto o durante il parto), sono classificate come genetiche, ambientali, legate alla scrofa e/o ai suinetti (figura 2) (Vanderhaeghe *et al.*, 2013).

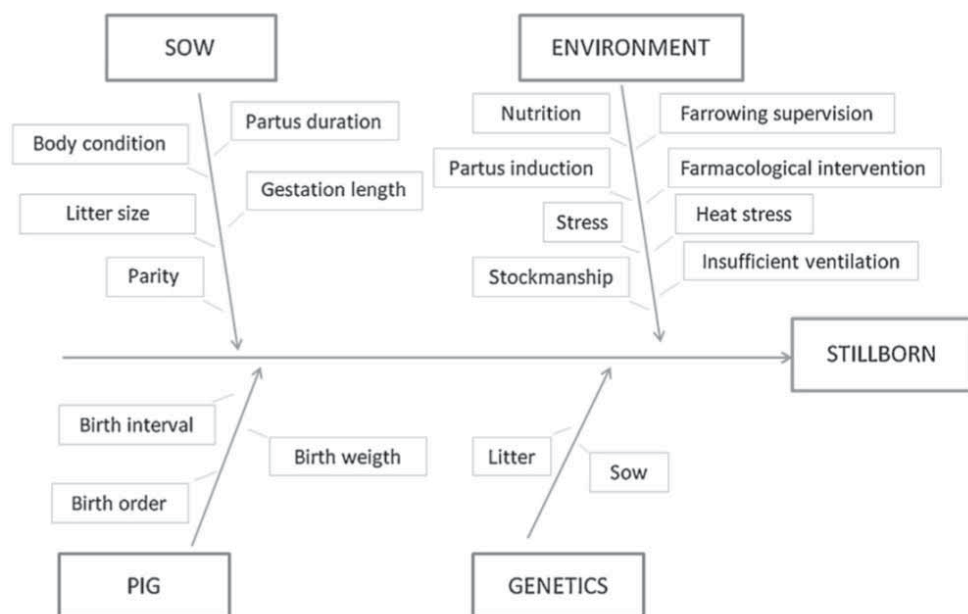


Figura 2: Fattori non infettivi legati a suinetti nati morti (Vanderhaeghe *et al.*, 2013).
Figure 2: Non-infectious factors associated with stillborn piglets (Vanderhaeghe *et al.*, 2013).

In questo studio retrospettivo la prevalenza di positività riscontrate in casi di aborto, è stata valutata correlando, per ciascun agente eziologico, il numero di casi positivi al numero di casi testati. Come già accennato in precedenza, il totale di casi testati non coincide per ogni agente eziologico considerato in quanto, trattandosi di uno studio retrospettivo, non sono state effettuate le stesse indagini diagnostiche in modo standardizzato per ogni caso. Nella scelta delle indagini diagnostiche da effettuare, infatti, bisogna considerare differenze legate alla manifestazione clinica del caso oltre che al momento della gestazione in cui si è presentata l'insorgenza dell'aborto.

Il virus della PRRS è stato rilevato nel 19% dei casi, il PCV3 era presente nel 18,5% e PCV2 nel 18,3% dei casi.

I casi positivi per PRRSV (164) e per PCV2 (121) sono risultati i più frequenti tra tutti i casi positivi (310) e risultati simili sono stati osservati in 549 casi di aborto in Lombardia tra il 2011 e il 2013 in cui, a fronte di un totale di 323 casi positivi, 138 erano positivi per PCV2 e 108 erano positivi per PRRSV (Salogni *et al.*, 2016). Non sorprende l'elevata prevalenza di PRRSV da casi di aborto, che da molti anni a questa parte è senza dubbio il principale responsabile di turbe riproduttive nella nostra realtà produttiva. Questo è sicuramente legato alle caratteristiche intrinseche di PRRSV in quanto, trattandosi di un virus a RNA a singolo filamento positivo, risulta essere soggetto a frequenti mutazioni e ricombinazioni. A causa della variabilità genetica e fenotipica del PRRSV l'efficacia degli interventi vaccinali spesso risulta essere sub-ottimale (Franzo *et al.*, 2021), così come la protezione immunitaria fornita dai ceppi endemici nei confronti di ceppi di PRRSV di nuova introduzione all'interno degli allevamenti.

Il *Circovirus* suino di tipo 2 (PCV2) è stato rilevato mediante qPCR in 121 casi, tuttavia questo risultato non ha trovato conferma dalle indagini istopatologiche e immunoistochimiche. La diagnosi di PCV2-RD (PCV2 *Reproductive Disease*) prevede tre criteri diagnostici: 1. aborti tardivi e nati morti, in alcuni casi con evidente ipertrofia cardiaca fetale; 2. presenza di lesioni cardiache caratterizzate da fibrosi estesa e/o miocarditi necrotizzanti; 3. presenza di elevate quantità di PCV2 nelle lesioni miocardiche e in altri tessuti fetali (Segalés, 2012).

Questi criteri sono indispensabili per la diagnosi di PCV2-RD in fase acuta, mentre per forme che si sviluppano in un arco temporale maggiore la PCR quantitativa è **considerata già di per sé significativa per la diagnosi di PCV2-RD** (Segalés *et al.*, 2012; Segalés, 2012). In particolare, valori superiori a 10^7 copie di DNA di PCV2/grammo di tessuto patologico ottenuto con PCR quantitativa, sono stati descritti come fortemente indicativi di PCV2-RD e valori maggiori di 10^5 copie di genoma virale di PCV2/grammo sono stati rilevati nei tessuti fetali di feti con miocarditi (Hansen *et al.*, 2010; Segalés, 2012). Nel presente studio, nei casi in cui è stato effettuato l'esame istologico non è stata osservata la presenza di miocarditi, e in soli 20 casi è stata rilevata una quantità maggiore di 10^7 copie di genoma virale di PCV2/grammo di materiale patologico. In 6 di questi ultimi casi l'esame istologico è stato effettuato ed è risultato negativo per la presenza di lesioni miocardiche caratteristiche ed in 5 casi è risultata negativa anche l'indagine immunoistochimica.

Il PCV3 è stato descritto per la prima volta nel 2015 in USA in suini con lesioni cardiache e infiammazione multisistemica (Phan *et al.*, 2016), in scrofe con lesioni ascrivibili a PDNS (*Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*) e in feti (Palinski *et al.*, 2017) e il suo ruolo come agente patogeno in genere e abortigeno in particolare è stato molto dibattuto. Il solo rilevamento del virus nei tessuti in assenza di evidenza di lesioni non è sufficiente per poter formulare una diagnosi in quanto si tratta di un virus endemico (Arruda *et al.*, 2019). Sono infatti stati proposti tre criteri diagnostici per la definizione di caso di PCV-3-RD (PCV3 *Reproductive Disease*): 1. problemi riproduttivi tardivi ed elevata mortalità perinatale; 2. infiammazione perivascolare in diversi tessuti da linfoplasmocitica a linfoistiocitica; 3. presenza di quantità da moderata a elevata di PCV3 nei tessuti con lesioni (Saporiti *et al.*, 2021a). In alcuni studi condotti in USA e in Europa la presenza di PCV3 in tessuti fetali è stata associata a lesioni istologiche tra cui miocarditi, arteriti e periarteriti ed è stata confermata da ibridazione in situ (Arruda *et al.*, 2019; Saporiti *et al.*, 2021b). In Italia, PCV3 è stato descritto nel 2017 in due pool di tessuti prelevati da suinetti nati morti e da feti, provenienti da due aziende lombarde in cui si verificavano turbe riproduttive. In entrambi i casi la quantità di copie di genoma virale di PCV3 per grammo di tessuto analizzato è risultata essere elevata e maggiore di 10^{10} , i campioni non erano positivi verso altri agenti eziologici testati mediante PCR e gli esami istologici effettuati non dimostrarono lesioni significative (Faccini *et al.*, 2017). Nel nostro studio 38 casi sono risultati positivi in PCR per la presenza di PCV3 e in 20 di questi (52,6%) PCV3 è stato l'unico agente eziologico rilevato, tuttavia il dato istopatologico non ha confermato questo risultato. Inoltre, nonostante il PCV3 sia risultato tra gli agenti eziologici maggiormente prevalenti, il numero totale di casi testati per PCV3, durante gli anni considerati, è stato inferiore rispetto a quello dei casi testati per gli altri agenti eziologici.

Le specie di *Chlamydia* che possono infettare il suino sono *Chlamydia suis*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum* e *Chlamydia psittaci* (Schautteet *et al.*, 2011). Nei 458 casi di aborto analizzati per *Chlamydia spp.*, i positivi sono stati il 4,8% del totale e, limitatamente alla specie *Chlamydia suis*, da uno studio condotto in aziende suinicole del Nord Italia tra il 2018 e il 2020, il 12% del totale dei campioni analizzati è risultato positivo per *Chlamydia suis* e il 18% di questi erano feti (De Lorenzi *et al.*, 2021). La prevalenza di casi di aborto positivi per

PPV e per *Leptospira spp.* è risultata inferiore del 3%. I casi positivi per PPV (18) erano tra i meno frequenti tra tutti i casi positivi (310) e in Nord Italia tra il 2011 e il 2013 erano stati osservati risultati simili (non considerando le frequenze inferiori di positività registrate nei confronti di agenti eziologici non indagati in questo studio) (Salogni *et al.*, 2016).

CONCLUSIONI

Dai risultati emersi da questo studio retrospettivo si conferma che le turbe riproduttive della scrofa sono solo in pochi casi (meno del 50%) conseguenti ad infezioni sostenute da agenti eziologici abortigeni ed è quindi importante porre attenzione a tutti i fattori di rischio anche non infettivi che possono provocare aborto. Inoltre, limitatamente agli agenti abortigeni infettivi si può constatare quanto sia importante l'impiego dell'istologia e dell'immunoistochimica, in modo da poter effettuare diagnosi di malattia e non solo la determinazione della presenza di un agente potenzialmente patogeno. Questo è particolarmente importante nei casi di positività, ottenuta con indagini biomolecolari, per PCV2 e PCV3.

Infine, i dati riportati in questo studio risultano utili per poter avere un'immagine della prevalenza degli agenti abortigeni circolanti in regioni ad elevata densità di allevamenti suinicoli quali la Lombardia e l'Emilia Romagna negli ultimi 5 anni e potrebbe essere utile per studi futuri per poter avere indicazioni sull'andamento di tali prevalenze.

RINGRAZIAMENTI

Parte dei dati analizzati in questo studio derivano dal PRC2017007 finanziato dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

1. Almond G.W., Flowers W.L., Batista L., D'Allaire S. (2006) "Diseases of the Reproductive System" in Straw B. E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D. J. "Disease of Swine", 9a ed. UK, Wiley-Blackwell, 723-749.
2. Arruda B., Piñeyro P., Derscheid R., Hause B., Byers E., Dion K., Long D., Sievers C., Tangen J., Williams T., & Schwartz K. (2019) "PCV3-associated disease in the United States swine herd". *Emerging microbes & infections*, 8(1), 684–698. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1613176>
3. Bedir O., Kilic A., Atabek E., Kuskucu A.M., Turhan V., Basustaoglu A.C. (2010), "Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira spp.* by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay", *Pol J Microbiol* 59: 167-73.
4. Christianson W.T. (1998) "Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death." *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 8(3):623-39. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30708-8. PMID: 1446274.
5. Christianson W. T. (1992) "Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death." *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 8(3), 623–639. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30708-8](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30708-8).
6. De Lorenzi G., Rigamonti S., Lodola C.M., Bazzucchi M., Lauriano A., Prati P., Vicari N. (2021) "Prevalence of *Chlamydia suis* in swine samples analysed from 2018 to 2020: an emerging pathogen?". *ESPHM 2020+1: 12th European Symposium on Porcine Health Management: proceedings, 14th-16th April, 2021*. p 302
7. Ehrlich R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. (2006) "Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies." *Mol Cell Probes*. 2006 Feb;20(1):60-3. doi: 10.1016/j.mcp.2005.09.003. Epub 2005 Dec 5. PMID: 16330186.
8. Faccini S., Barbieri I., Gilioli A., Sala G., Gibelli L.R., Moreno A., Sacchi C., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A. (2017) "Detection and genetic characterization of Porcine

- circovirus type 3 in Italy.” *Transbound Emerg Dis.* 64(6):1661-1664. doi: 10.1111/tbed.12714. Epub 2017 Sep 17. PMID: 28921870.
8. Franzo G., Barbierato G., Pesente P., Legnardi M., Tucciarone C. M., Sandri G., Drigo, M. (2021). “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Epidemiology in an Integrated Pig Company of Northern Italy: A Multilevel Threat Requiring Multilevel Interventions”. *Viruses*, 13(12), 2510. <https://doi.org/10.3390/v13122510>
 9. Kim J., Choi C., Han D.U., Chae C. (2001) “Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR”. *Vet Rec.* 149: 304-305.
 10. Kirkwood R. N., Althouse G.C., Yaeger, M.J., Carr J., and Almond G.W. (2012) “Diseases of the Reproductive System ” in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. “Disease of Swine”, 10a ed. UK, Wiley-Blackwell, 329-347.
 11. Hansen M.S., Hjulsager C.K., Bille-Hansen V., Haugegaard S., Dupont K., Høgedal P., Kunstmann L., Larsen L.E. (2010) “Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures”. *Vet Microbiol.* Jul 29;144(1-2):203-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.038. Epub 2010 Jan 11. PMID: 20097019.
 12. Maldonado J., Segalés J., Martínez-Puig D., Calsamiglia M., Riera P., Domingo M., Artigas C. (2005). “Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain”. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 169(3), 454–456. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.05.007>
 13. Opriessnig T., S. Yu, J.M. Gallup, R.B. Evans, M. Fenaux, F. Pallares, E.L. Thacker, C.W. Brockus, M.R. Ackermann, P. Thomas, X.J. Meng and P.G. Halbur (2003) “Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus”. *Vet. Pathol.* 40, 521-529.
 14. Palinski R., Piñeyro P., Shang P., Yuan F., Guo R., Fang Y., Byers E., Hause B. M. (2017) “A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure”. *Journal of virology*, 91(1), e01879-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01879-16>
 15. Phan T.G., Giannitti F., Rossow S., Marthaler D., Knutson T.P., Li L., Deng X., Resende T., Vannucci F., Delwart E. (2016) “Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation.” *Virology* 11;13(1):184. doi: 10.1186/s12985-016-0642-z. Erratum in: *Virology* 2017 Apr 28;14 (1):87. PMID: 27835942; PMCID: PMC5105309.
 16. Salogni C., Lazzaro M., Giacomini E., Giovannini S., Zanoni M., Giuliani M., Ruggeri J., Pozzi P. Pasquali, P. Boniotti M. B., Alborali, G. L. (2016). “Infectious agents identified in aborted swine fetuses in a high-density breeding area: a three-year study”. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 28(5), 550–554. <https://doi.org/10.1177/1040638716656024>
 17. Saporiti V., Franzo G., Sibila M., Segalés J. “Porcine circovirus 3 (PCV-3) as a causal agent of disease in swine and a proposal of PCV-3 associated disease case definition.” (2021a) *Transbound Emerg Dis.* 68(6):2936-2948. doi: 10.1111/tbed.14204. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34184834.
 18. Saporiti V., Valls L., Maldonado J., Perez M., Correa-Fiz F., Segalés J., Sibila, M. (2021b) “Porcine Circovirus 3 Detection in Aborted Fetuses and Stillborn Piglets from Swine Reproductive Failure Cases”. *Viruses*, 13(2), 264. <https://doi.org/10.3390/v13020264>
 19. Schautteet K., Vanrompay D. (2011) “Chlamydiaceae infections in pig.” *Vet Res.* Feb 7;42(1):29. doi: 10.1186/1297-9716-42-29. PMID: 21314912; PMCID: PMC3041669.

20. Segalés J. (2012) "Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis". *Virus Res.*; 164(1-2):10-9. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.007. Epub 2011 Oct 17. PMID: 22056845.
21. Segalés J., Allan G. M., Domingo M. (2012) "Porcine Circoviruses " in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. "Disease of Swine", 10a ed. UK, Wiley-Blackwell, 405-417.
22. Vanderhaeghe C., Dewulf J., de Kruif A., Maes D. (2013) "Non-infectious factors associated with stillbirth in pigs: a review". *Animal reproduction science*, 139(1-4), 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.007>