

SCROFE CONVENZIONALI FECONDATE CON SEME ARTIFICIALMENTE INFETTATO CON CIRCOVIRUS SUINO TIPO2 (PCV2)

CONVENTIONAL SOWS INSEMINATED WITH ARTIFICIALLY PCV2 INFECTED SEMEN

SARLI G., MORANDI F., PANARESE S., BACCI B., FERRARA D., FUSARO L.,
BACCI M.L., GOVONI N., DOTTORI M.¹, BONILAURI P.¹, LELLI D.², LEOTTI G.³,
VILA T.⁴, JOISEL F.⁴, OSTANELLO F.

*Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna; IZSLER Reggio Emilia¹ e Brescia²; Merial
Italia S.p.A.³; Merial SAS, France⁴*

Parole chiave: PCV2, infezione sperimentale, gravidanza, scrofe convenzionali.

Key Words: PCV2, experimental infection, pregnancy, conventional sows.

RIASSUNTO. Sei scrofe convenzionali sono state inseminate con seme sperimentalmente infettato con PCV2 mentre 3 soggetti con seme addizionato del solo terreno di coltura privo del virus. Solo 3 dei 6 animali sperimentalmente infettati sono risultati gravidi ad un controllo ecografico al 29° giorno post-inseminazione, mentre tutti i controlli sono risultati gravidi. La viremia è stata dimostrata in 4 soggetti su 6 del gruppo degli infetti che, rispetto al gruppo di controllo, hanno anche presentato titoli anticorpali anti PCV2 più persistenti. Il soggetto del gruppo degli infetti a più basso titolo anticorpale (1:100) all'inizio della sperimentazione ha mostrato la viremia più prolungata ed il maggiore numero di feti PCV2 positivi (10 su 16). In una placenta si è rilevata necrosi coagulativa focale del chorion positiva all'indagine immunoistochimica per PCV2. Lo studio complessivamente ha permesso di dimostrare che: 1) l'esposizione intrauterina in suini convenzionali può riprodurre l'infezione; 2) un basso titolo anticorpale aumenta la probabilità di infezione; 3) l'infezione da PCV2 contestualmente alla fecondazione, riduce la probabilità di gravidanza; 4) il substrato anatomoistopatologico della sofferenza fetale va individuato anche in lesioni placentali.

ABSTRACT. Six conventional sows were inseminated with PCV2 added semen (infected) and three animals with semen and viral medium (controls). At ultrasonography (day 29 post insemination), only three out of the six infected animals were pregnant, unlike controls, all pregnant. Viremia was demonstrated in 4 out of 6 infected animals, along with a mean antibody titre higher only in exposed sows. Among infected, the sow with the lowest anti-PCV2 titre (1/100) at the beginning of the experiment, kept displaying positive blood results over time and had also the highest number of PCV2 positive foetuses (10/16). One placenta displayed mild focal necrosis of the chorionic epithelium, positively stained by IHC for PCV2 antigen. The results obtained suggest that: 1) conventional sows can be infected by intrauterine exposition; 2) low antibody titres increase the probability of infection; 3) PCV2 infection close to insemination time reduces the pregnancy rate; 4) placental lesions may represent an additional cause of fetal suffering.

INTRODUZIONE

Il ruolo patogeno di PCV2 è stato accertato per la prima volta nel 1998 in Canada dove fu associato alla sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (*post-weaning*

multisystemic wasting syndrome - PMWS). Da allora, il coinvolgimento di PCV2 è stato riconosciuto anche in altre forme patologiche del suino quali: la sindrome dermatite nefrite (PDNS), alcune malattie respiratorie del suino (inclusa la polmonite proliferativa e necrotizzante - PNP), la linfadenite necrotizzante e l'enterite granulomatosa (Harding, 2004; Chae, 2005, Ségales *et al.*, 2005). Tutte queste patologie sono ora identificate dall'acronimo PCVDs (*porcine circovirus diseases*).

Negli ultimi anni sono state annoverate fra le PCVDs anche alcune patologie riproduttive. Le prime segnalazioni di campo in Canada (West *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2001) e in Danimarca (Ladekjær-Mikkelsen *et al.*, 2001) ed il primo studio organico sull'argomento nel Nord Italia nel 2004 (Corradi *et al.*, 2004) sono relative all'isolamento di PCV2 da prodotti di aborto/natimortalità. Da allora molta attenzione è stata rivolta, sia con indagini epidemiologiche mirate, sia con infezioni sperimentali, a definire il possibile ruolo rivestito da questo virus nella patologia riproduttiva del suino. È stato dimostrato che un fattore di rischio importante per la patologia riproduttiva indotta da PCV2 è rappresentato da un episodio viremico che si realizza in una scrofa gravida con basso titolo anticorpale specifico (Calsamiglia *et al.*, 2007). La viremia è infatti un fattore cruciale della trasmissione del virus dalla madre ai feti. Inoltre, tanto più a lungo questa si protrae, maggiore è la probabilità che tale evento si realizzi (Sanchez, 2003).

La viremia è il mezzo più frequente con cui PCV2 raggiunge l'embrione/feto; tuttavia, è stato dimostrato che PCV2 può infettare i prodotti del concepimento anche veicolato da seme o ovuli infetti (Cariolet *et al.*, 2001; Bielansky *et al.*, 2004; Mateusen, 2007), o come conseguenza dell'infezione delle vie genitali (Bielansky *et al.*, 2004). Oltre che mediante trasmissione verticale con i gameti, il virus può raggiungere i prodotti del concepimento attraversando la placenta, sia con meccanismo diretto (cioè con particelle virali libere nell'interstizio), sia veicolato da cellule, in particolare macrofagi, capaci di mascherare il virus ai meccanismi di controllo immunitario anche in animali sieropositivi (Pensaert *et al.*, 2004).

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

Scopo del presente studio è stato quello di valutare: a) la possibilità di infettare scrofe convenzionali mediante l'utilizzo di seme contenente PCV2 e, b) il ruolo di PCV2 nella fase iniziale e intermedia di gravidanza.

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

Materiali e metodi

Animali

Nove scrofette Large White (95 kg di p.v., sei mesi di età), sono state acquistate presso un allevamento commerciale, acclimatate per cinque giorni e suddivise in due gruppi: controlli (gruppo C, 3 animali, identificati, singolarmente, come scrofa C28, C30 e C31) e infetti (gruppo I, 6 soggetti, I25, I26, I27, I29, I32, I33). I soggetti sono stati stabulati in *box* singoli e alimentati due volte al giorno con una razione di mangime da gestazione. I due gruppi in sperimentazione sono stati stabulati in due locali diversi e sono state garantite rigorose misure di biosicurezza.

Protocollo sperimentale

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

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

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

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

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

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

Due giorni prima della fecondazione (giorno -2), da ciascuna scrofa sono stati realizzati tamponi vaginali, nasali e rettali, ed è stato prelevato un campione ematico. Successivamente gli stessi prelievi sono stati eseguiti con cadenza settimanale fino al 52° giorno post-inseminazione (DPI). Al fine di non interferire con il riconoscimento materno di gravidanza (giorni 13-18), le scrofe non sono state sottoposte a prelievo ematico il 14° giorno post-inseminazione. Lo schema del campionamento è riportato in Tabella 1. Al 29° giorno di gestazione, tutti gli animali sono stati sottoposti ad esame ecografico. Le scrofe non gravide sono state sacrificate, mentre gli animali gravidi sono invece stati soppressi al 52° (C31), 55° (I25 e I26) e 56° (C28 e I29) giorno.

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

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

Aliquote dei campioni sono state utilizzate per: 1) la ricerca del genoma virale mediante real time PCR (RT-PCR) e PCR qualitativa; 2) l'indagine istopatologica su un prelievo speculare (la metà opposta al campione usato per la RT-PCR) fissato in formalina tamponata al 10%,

incluso in paraffina e colorato con ematossilina ed eosina (H-E) e metodica immunistoichimica per PCV2.

Sui tessuti fissati in formalina è stata realizzata una colorazione immunistoichimica con l'ausilio di anticorpi anti-PCV2 (Mab F217), alla diluizione di 1/100 in tampone fosfato, forniti dal Dr. G. Allan (Veterinary Sciences Division, Belfast, UK), secondo il metodo descritto da Sarli *et al.* (2009), modificato utilizzando un complesso di rilevazione streptavidina-biotina-perossidasi polimerico (SuperPicture kit peroxidise, Zymed® Lab).

Indagini sierologiche

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

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

Metodica PCR

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

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

RISULTATI

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

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

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

Come riportato nella figura 1, nei soggetti I27 e I32 non sono state osservate variazioni nel titolo del P4 fino ai giorni 42 e 28, rispettivamente (quindi non è possibile dimostrare l'estro nei giorni precedenti). I valori di P4 sono andati invece aumentando nel soggetto I33 dopo il 35° giorno, possibile espressione di estro dopo il 35°, seppur senza segni clinici evidenti.

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

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

L'andamento dei titoli anticorpali per PCV2 durante il periodo di sperimentazione ha evidenziato una diminuzione (seppur non significativa) già al secondo prelievo (giorno 7)

negli animali del gruppo C; al contrario, i soggetti del gruppo I hanno mostrato valori più elevati, con diminuzione soltanto dopo il 42° giorno.

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

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

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

Le scrofe gravide del gruppo I hanno presentato rispettivamente: 16, 11 e 7 feti, mentre i due controlli 11 e 8 (Tabella 2). Non sono state rilevate lesioni macroscopiche a carico dei feti.

Microscopicamente, in una sola placenta della scrofa I25, risultata positiva in RT-PCR per PCV2 con il più alto titolo virale ($>10^8$), si è osservata una necrosi coagulativa focale dell'epitelio del chorion. Alcune cellule di quest'ultimo hanno mostrato positività immunocitochimica, di intensità lieve, per PCV2, con segnale localizzato a livello citoplasmatico. Inoltre, nel feto corrispondente si è registrata debole immunopositività per lo stesso agente nel citoplasma di alcuni epatociti.

DISCUSSIONE

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

Il modo più frequentemente utilizzato, in modelli sperimentali, per produrre l'esposizione dei

feti è quello di causare un episodio viremico in scrofe gravide (Cariolet *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2005). Il modello sperimentale impiegato in questo studio ha avuto lo scopo di valutare se l'impiego di seme infetto potesse avere conseguenze più gravi sulla gravidanza e/o sul feto, in funzione della possibilità di moltiplicazione locale (uterina) del virus e quindi di esposizione nelle fasi iniziali della gravidanza, rispetto ad un evento viremico primario. Le viremie nei soggetti infetti sono state registrate piuttosto tardivamente (prevalentemente dal 21° giorno in poi) suggerendo che la moltiplicazione in utero è solo transitoria e non amplifica molto la carica virale. Verosimilmente, la viremia è stata la conseguenza del raggiungimento di organi bersaglio più idonei alla replicazione virale, come il tessuto linfoide che, quindi, con il tempo, ha garantito e mantenuto la viremia stessa. Sembra quindi ipotizzabile, anche alla luce di quanto asserito da Segalés *et al.* (2007), che le vie genitali non siano un sito usuale di moltiplicazione del PCV2. In tal senso, l'entrata del virus con il seme non rappresenterebbe tanto un momento importante di esposizione, quanto piuttosto un evento prodromico per un possibile raggiungimento di organi bersaglio più idonei. In quest'ottica l'immunità gioca un ruolo importante nel ridurre la quantità di virus che può raggiungere i tessuti linfoidi prima e che attraverserà la placenta dopo. Ciò poiché la diffusione del virus agli organi bersaglio e la conseguente viremia vengono ostacolate dal titolo anticorpale anti-PCV2 (Calsamiglia *et al.*, 2007). A conferma di ciò, la scrofa I25, che presentava il più basso titolo anticorpale anti PCV2 al giorno -2, ha mostrato non solo viremia (in due prelievi successivi, giorno 21 e 35) ed eliminazione fecale, ma anche numerosi tessuti positivi, oltre che 10 feti positivi su 16 di cui per 8 vi era concordanza tra feto positivo e tratto uterino corrispondente.

E' noto in letteratura (Sanchez *et al.*, 2003) come l'esposizione in utero al PCV2 non determini l'infezione di tutti i feti, risultato registrato anche nel nostro esperimento. Inoltre, i risultati prodotti sembrano dimostrare che PCV2 non si replichi soltanto nei tessuti fetali, come riportato in letteratura, ma anche nelle cellule dell'epitelio del chorion, rappresentando una causa di necrosi condizionante la morte fetale con natimortalità/mummificazione. Quindi anche per il PCV2, analogamente a quanto riportato in talune patologie a diversa eziologia (Foster, 2007) anche le lesioni placentali si possono considerare il substrato anatomoistopatologico della patologia riproduttiva.

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

CONCLUSIONI

Lo studio ha permesso di dimostrare che: 1) l'esposizione intrauterina in suini convenzionali può riprodurre l'infezione; 2) un basso titolo anticorpale aumenta la probabilità di infezione, dimostrando un ruolo protettivo degli anticorpi anti-PCV2 anche qualora la via di ingresso sia quella endouterina; 3) l'infezione da PCV2 contestualmente alla fecondazione, sembra ridurre la probabilità di gravidanza; 4) il substrato anatomoistopatologico della sofferenza fetale va individuato anche in lesioni placentali.

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

Studio condotto con finanziamento Merial sas, Lione, Francia.

BIBLIOGRAFIA

1. Bielansky A., Larochelle R., Argyle J., Magar R. (2004). Distribution of PCV-2 DNA in the reproductive tract, oocytes and embryos of PCV-2 antibody-positive pigs. *Vet Rec* 155, 597-598.
2. Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Meriardi G., Dottori M. (2003). Longitudinal study of PRRSV infection in 6 breeding herds by ELISA-antibody test and serum pooled PCR. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases- Roma June 29th July 2nd, pp.98-99.
3. Brocchi, E., Berlinzani, A., Callegari, S., Gamba, D., Civardi, A. (1990). Realizzazione di un test ELISA-competizione per distinguere animali infetti da virus di Aujeszky da animali vaccinati con vaccini gI-deleti. *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie* 44, 913-917.
4. Calsamiglia M., Fraile L., Espinal A., Cuxart A., Seminati C., Martín M., Mateu E., Domingo M., Segalés J. (2007). Sow porcine circo virus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res Vet Sci* 82, 299-304.
5. Cariolet R., Blanchard P., Le Dimna M., Mahé D., Jolly I.P., de Boissésou C., Truong C., Echobichon P., Madec F., Jestin A. (2001). Experimental infection of pregnant SPF sows with PCV2 through tracheal and muscular routes. *Proc. of Congress on ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates, Saint-Malo*, p. 128.
6. Chae C. (2005) A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 169, 326-336.
7. Cordioli, P., Sala, G., Brocchi, E., Gamba, D., De Simone, F., (1996). Diagnostic use of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Proc. 14th International Pig Veterinary Society Congress*, p. 86.
8. Corradi A., Dottori M., Gaiadella L., Rosignoli C., Cantoni A.M., Luppi A., Bonilauri P., Meriardi G., Faccini S., Costa A., Leotti G., Cabassi E.: Infezione da porcine circo virus tipo 2 (PCV2) e aborto. *Atti XXX Meeting Annuale SIPAS*, 215-221, 2004.
9. Foster R., (2007). Female reproductive system. In McGavin and Zachary "Pathologic basis of Veterinary Diseases" cap. 18, IV Ed., Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 1290-1303.
10. Harding J.C.S. (2004). The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol* 98, 131-135.
11. Johnson C.S., Joo H.S., Direksin K., Yoon K.J., Choi Y.K. (2002). Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 14, 507-512.
12. Katz J.B., Pedersen J.C. (1992). Molecular analysis of pseudorabies viral vaccines and their rapid differentiation from wild-type isolates using DNA-amplified glycoprotein I and thymidine kinase gene segment polymorphisms. *Biologicals* 20, 187-195.
13. Kim J., Choi C., Han D.U., Chae C. (2001) Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. *Vet Rec.* 149, 304-5.
14. Ladekjaer-Mikkelsen A.S., Nielsen J., Storgaard T., Bøtner A., Allan G., McNeilly F. (2001). Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Vet Rec* 148, 759-760.
15. Mateusen B., Maes D.G., Van Soom A., Lefebvre D., Nauwynck H.J. (2007). Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenology* 68, 896-901.
16. 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.
17. Park J.S., Kim J., Ha Y., Jung K., Choi C., Lim J.K., Kim S.H., Chae C. (2005). Birth

- abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol* 132, 139-144.
18. Rose N., Blanchard P., Cariolet R., Grasland B., Amennay N., Oger A., Durandz B., Balaschy M., Jestin A., Madec F. (2007). Vaccination of porcine circovirus type 2 (PCV2)-infected sows against porcine parvovirus (PPV) and erysipelas: effect on post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and on PCV2 genome load in the offspring. *J Comp Pathol* 136, 133-144.
 19. Sala, G., Rigola, S., Alborali, G.L., Brocchi, E., Cordioli, P. (2000). Development of monoclonal antibodies based ELISAS for the detection of antibodies against porcine circovirus type 1 and type 2. In: Proc. 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, pp. 253–254.
 20. Sanchez R.E., Meerts P., Nauwynck H.J., Penseart M.B. (2003). Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early post-natal life. *Vet. Microbiol* 95, 15-25.
 21. Segales J., Allan G.M., Domingo M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Review* 6, 119-142.
 22. Schmoll F., Lang C., Steinrigl A.S., Schulze K., Kauffold J. (2008). Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 69, 814-821.
 23. Tamanini C., Bono G., Cairoli F., Chiesa F. (1985). Endocrine responses induced in anestrus goats by the administration of different hormones after fluoregestone acetate treatment. *Anim Reprod Sci* 9, 357-364.

Tabella 1: Schema temporale dei campionamenti e tipo di test su di essi eseguito.

Table 1: Samplings and lab tests planning.

Campioni e test di laboratorio	Giorni post-inseminazione											
	-2	7	14	21	28	35	42	49	52*	55*	56*	
PCR tamponi (vaginale, rettale, nasale)	PCV2 PRRSV PPV ADV	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2
PCR sangue	PCV2 PRRSV PPV ADV	PCV2	/	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2
Sierologia**	PCV2	PCV2	/	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2
N° identificativo	tutte le scrofe	tutte le scrofe	tutte le scrofe	tutte le scrofe	tutte le scrofe	tutte eccetto C30, C32	tutte eccetto C30, C32	I25, I26, C28, I29, C31	C31	I25, I26	C28, I29	

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

** al giorno -2 DPI e al giorno dell'eutanasia è stata eseguita la titolazione anticorpale anche per PRRSV, PPV e ADV.

Notes: * pre-euthanasia samplings.

** anti-PRRSV, PPV and ADV antibody titres were evaluated at -2 DPI and on suppression day.

Tabella 2: tessuti e feti testati in RT-PCR e relativi risultati.
Table 2: tissues and fetuses RT-PCR assessment and results.

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

Note: *si riferisce al titolo sierico per pcv2 ad inizio sperimentazione; ** viene indicato il giorno/i di prelievo dopo la inseminazione; *** dei 16 tratti uterini, corrispondenti ognuno ad un feto, in 8 campioni la PCR per l'utero era positiva, ma solo in 7 casi vi era concordanza tra positività nell'utero e nel feto.

Notes: *serum titre at the starting of experimental study; ** DPI sampling when viremia was recorded; *** out of the 16 uterine tract samples, each corresponding to a fetus, 8 were PCV2 positive by PCR but only in 7 cases a concordance of the positive PCR result was revealed in both foetus and uterus tissues.

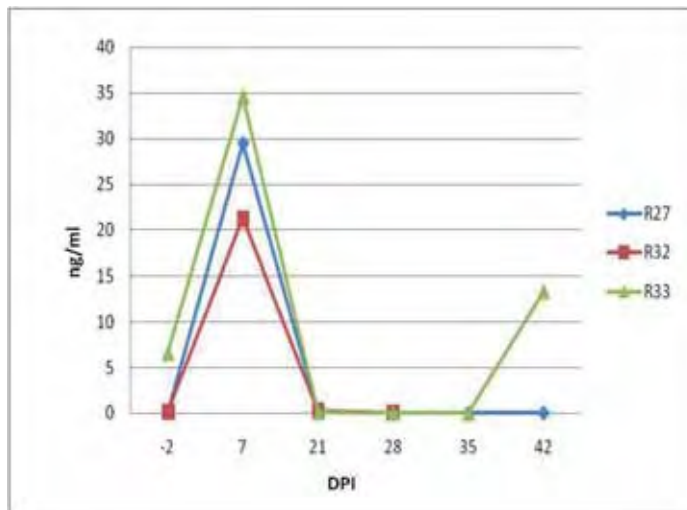


Figura 1: Scrofe non gravide: titolo sierico del progesterone (P4).
Figure 1: Non pregnant sows: progesteron (P4) serum levels.

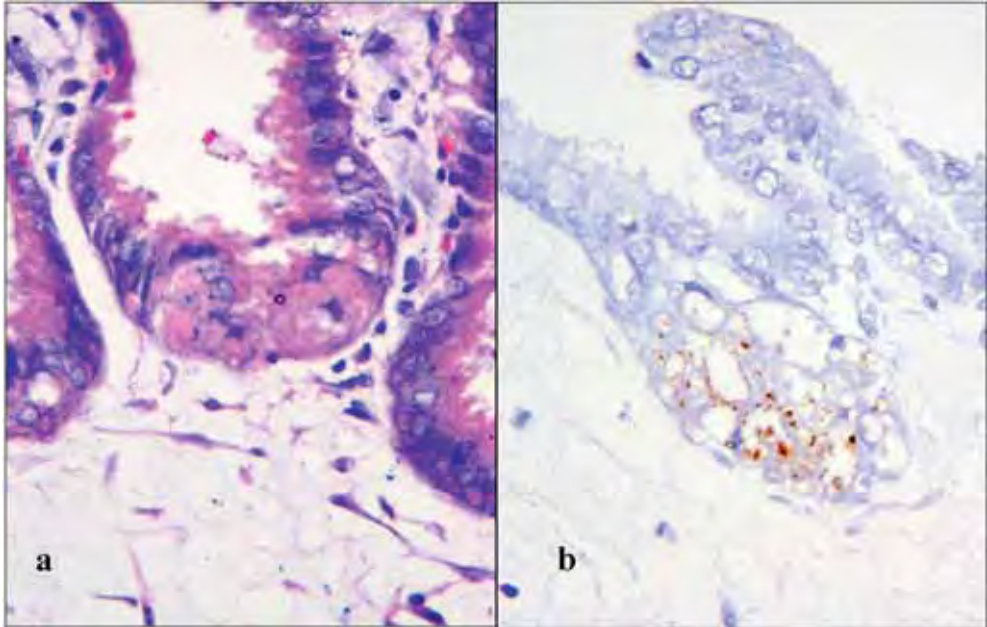


Figura 2: Scrofa. Placenta. Chorion. Focolaio di necrosi coagulativa (a) positivo alla reazione immunistochimica, colorazione marrone, per PCV2 (b). (a): Ematossilina-eosina, 40x; (b) reazione immunistochimica per PCV2, 40x.

Figure 2: Sow. Placenta. Chorion. Coagulative necrosis (a) showing a brown, positive, immunohistochemical staining for PCV2 (b). (a): Haematoxylin-eosin, 40x; (b) immunohistochemistry to PCV2, 40x.