

EFFETTO DELLA VACCINAZIONE ANTI-PCV2 SULL'ENTITÀ E DURATA DELL'ESCREZIONE VIRALE NELLE SCROFE

EFFECT OF PCV2 VACCINATION ON THE AMOUNTS AND DURATION OF VIRAL SHEDDING IN SOWS

Bianco C.¹, Sarli G.¹, Panarese S.¹, Bacci M.L.¹, Galeati G.¹, Dottori M.², Bonilauri P.²,
Lelli D.³, Leotti G.⁴, Vila T.⁵, Joisel F.⁵, Ostanello F.¹

¹*Dip. Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), Bologna, Italy;*

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER),
sezione di Reggio Emilia, Via Pitagora 2, 42100, Reggio Emilia, Italy;*

³*IZSLER, sezione di Brescia, Via A. Bianchi 9, 25124, Brescia, Italy;*

⁴*Merial Italia SpA, Strada 6, Palazzo E/5, 20090 Milanofiori, Assago, Milano, Italy;*

⁵*Merial SAS, 29 av Tony Garnier, 69007, Lyon, France*

Parole chiave: suino, circovirus suino tipo 2, seme, infezione

Keywords: Swine, Porcine circovirus type 2, Semen, Infection

RIASSUNTO

Vengono riportati i risultati di una prova condotta infettando sperimentalmente, con seme addizionato con porcine circovirus tipo 2b (PCV2b), due gruppi di scrofette di cui uno vaccinato (V) e l'altro non vaccinato (NV) nei confronti di PCV2. Nel corso della sperimentazione (55 giorni) il gruppo di soggetti NV ha presentato un maggior numero di episodi viremici ed ha eliminato il virus con maggiore frequenza per via fecale, nasale e vaginale. Nel gruppo NV, la proporzione di tessuti del comparto linfoide e riproduttivo infetti e la quantità di virus presente è risultata più elevata rispetto a quella del gruppo V. E' stata inoltre messa in evidenza la presenza di PCV2 in un feto del gruppo NV. I risultati indicano la possibilità che il vaccino limiti la diffusione endogena del virus e riduca la probabilità di trasmissione orizzontale e verticale.

ABSTRACT

The experimental trial here presented compares two groups of conventional gilts, one of which vaccinated (V) for porcine circovirus type 2 (PCV2) and one non-vaccinated (NV), both inseminated with PCV2b spiked semen. During the entire trial (55 days), the NV group showed more frequent viremia and PCV2 shedding. The tissues (lymphoid tissue set and reproductive tissue set) of the NV had a higher amount of PCV2 (percentage and virus load), and one fetal tissue positivity. This study supports effectiveness of the vaccine to limit the infection of the gilts and to reduce both horizontal and vertical transmission.

INTRODUZIONE

L'infezione da Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2) rappresenta uno dei principali problemi sanitari dell'allevamento suinicolo intensivo a livello mondiale. Le forme di malattia sostenute da PCV2 sono attualmente definite come Porcine Circovirus Associated Diseases (PCVADs) o Porcine Circovirus Diseases (PCVDs), rispettivamente in USA o in Europa (Opriessnig et al., 2007). Le PCVDs possono essere classificate in forme sistemiche, quali la sindrome del deperimento post-svezzamento (PMWS) o in forme localizzate quali enterite granulomatosa,

sindrome dermatite-nefrite (PDNS), forme respiratorie riconducibili alla porcine respiratory disease complex (PRDC), polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) e disordini riproduttivi (West et al., 1999; Harding, 2004; Kim et al., 2004; Opriessnig et al., 2007; Morandi et al., 2010; Segales, 2012).

Le problematiche riproduttive sono caratterizzate da natimortalità, mummificazione, morte embrionale, infertilità e aborto (sindrome SMEDI), in particolare in scrofette o scrofe con bassi titoli anticorpali (Cariolet et al., 2001; Madson et al., 2009; Hansen et al., 2010). Oltre a queste forme clinicamente evidenti, PCV2 è in grado di causare la nascita di suinetti viremici (Madson e Opriessnig, 2011). La trasmissione verticale o perinatale di PCV2 aumenta il rischio di infezione dei suinetti, condizionando così un aumento dell'incidenza di PCVDs. Ulteriore punto critico è la trasmissione orizzontale dell'infezione tra le scrofe gestanti.

Attualmente, un importante strumento di profilassi è rappresentato dall'utilizzo di vaccini che sono in grado sia di ridurre l'incidenza delle forme cliniche sia di limitare quantità e durata dell'escrezione virale. Nelle scrofe, la vaccinazione non solo previene i disordini riproduttivi (Pejsak et al, 2012), ma garantisce anche una buona immunizzazione passiva dei suinetti (Oh et al., 2012; Nechvatlova et al., 2011). Di conseguenza, l'efficacia della vaccinazione può essere valutata anche in funzione della riduzione del tempo e della quantità di virus eliminato da scrofe infette.

Il presente lavoro ha avuto come scopo quello di valutare se la vaccinazione anti-PCV2 fosse in grado di ridurre sia la quantità di virus eliminata dagli animali sia il numero di tessuti e di organi in cui il virus è presente. A tale scopo, sono state utilizzate delle scrofette convenzionali, considerate la categoria di riproduttori a maggior rischio nei confronti dell'infezione da PCV2 (Madson e Opriessnig, 2011), infettate sperimentalmente con seme a cui era stato addizionata una sospensione di PCV2b.

MATERIALI E METODI

Animali

Dodici scrofette convenzionali Large White sono state selezionate casualmente tra quelle presenti in allevamento, identificate individualmente e divise in modo casuale in 2 gruppi (NV: non vaccinate e V: vaccinate) composti da 6 animali ciascuno. Gli animali del gruppo V (V 1-6) sono stati vaccinati, a circa 5 mesi di età, con Circovac® (Merial, Lyon, France) nell'allevamento di origine secondo lo schema previsto dal produttore: una prima dose di 2 ml somministrata per via intramuscolare (i.m.) profonda nella regione retro-auricolare seguita da una seconda somministrazione 4 settimane dopo. A circa 160 giorni di vita gli animali sono stati trasportati nello stabulario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna e stabulati in box individuali e in due locali separati, uno per ogni gruppo. Il peso (media±dev st) era 98,5±9,4 Kg all'inizio del trattamento farmacologico.

Protocollo sperimentale

Il protocollo di sperimentazione è stato approvato dal Comitato Etico per la Sperimentazione Animale dell'Università di Bologna e dal Ministero della Salute. Lo studio è stato condotto in accordo con quanto previsto dalla normative europea relativamente alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali (Direttiva del Consiglio europeo, 86/609/EEC).

A -4 giorni dalla inseminazione artificiale (GPIA: giorni post inseminazione artificiale), a ciascun animale sono stati somministrati i.m. 1500 UI di eCG (equine chorionic gonadotropin) e a -2 giorni, 750 UI di hCG (human chorionic gonadotropin) con lo scopo di indurre il primo ciclo ovarico e di assicurare la superovulazione. Le scrofette sono state inseminate al giorno 0, circa 40 ore dopo la somministrazione di hCG. Gli animali di entrambi i gruppi sono stati inseminati con un'unica dose di seme (100 ml) a cui sono stati aggiunti 0,20 ml di una sospensione contenente $10^{4,4}$ TCID₅₀/50 µl di PCV2b. Il ceppo di PCV2b, è stato isolato nel corso di un focolaio italiano di PMWS e genotipizzato secondo i criteri proposti da Hesse et al. (2008). In via preliminare, il seme utilizzato è stato esaminato con una metodica RT-PCR per escludere la presenza di PCV2. Da +20 GPIA è stata quotidianamente eseguita un'osservazione clinica con lo scopo di evidenziare eventuali manifestazioni estrali. A +29 GPIA, è stata eseguita la diagnosi ecografica di gravidanza. Gli animali che avevano abortito o quelli risultati non gravidi sono stati soppressi. Gli animali gravidi sono stati soppressi a 52±3 GPIA.

A partire dal giorno -2 e fino alla soppressione sono stati settimanalmente prelevati campioni di sangue e sono stati eseguiti tamponi nasali, fecali e vaginali. A +14 GPIA non è stato eseguito il prelievo ematico allo scopo di non interferire con il riconoscimento materno di gravidanza. Per l'intero periodo di sperimentazione, è stata misurata quotidianamente la temperatura rettale ed è stata condotta una osservazione clinica. L'accesso agli stabulari è stato limitato al solo personale qualificato e sono state applicate rigorose misure di biosicurezza.

Alla necropsia è stata valutata l'eventuale presenza di lesioni macroscopiche e sono state prelevate porzioni dei seguenti organi e tessuti: tonsille; linfonodi inguinali superficiali, del mesometrio, tracheobronchiali, mesenterici; milza (organi linfoidi); ovaie (sono stati contati follicoli, corpi lutei e corpi albicanti), salpinge, utero, cervice e vagina (animali non gravidi), feto e placenta corrispondente, piccolo intestino (duodeno digiuno e ileo), fegato, rene, cuore e polmone. Ogni feto è stato pesato e misurato per determinarne l'età (Almond et al., 2006); sono stati prelevati campioni di liquido amniotico, allantocorion e tratto uterino corrispondente, milza, cuore e fegato. Per evitare possibili cross contaminazioni è stato utilizzato strumentario chirurgico sterile. I campioni sono stati congelati per l'indagine di biologia molecolare e fissati in formalina per l'indagine istologica.

Indagini sierologiche

La determinazione dei titoli anticorpali anti PCV2 è stata condotta sui campioni di siero, analizzando diluizioni seriali in base 6; sui sieri prelevati il giorno -2 e il giorno della soppressione è stata condotta la ricerca di anticorpi anti Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV), Aujeszky's Disease virus (ADV) e Porcine Parvovirus (PPV).

La ricerca di anticorpi nei confronti di PCV2, PRRSV, ADV e PPV è stata effettuata utilizzando test ELISA competitivi standardizzati presso l'IZSLER di Brescia.

La determinazione della concentrazione del progesterone sierico (P4) è stata eseguita a -2, +7, +21, +28 e +35 GPIA (o da un prelievo eseguito prima della soppressione) utilizzando una metodica radioimmunologica (Tamanini et al., 1985).

Indagini virologiche

L'estrazione del genoma virale di PCV2 dai campioni prelevati in vivo (siero, tamponi nasali, vaginali e rettali) e alla necropsopia è stata realizzata mediante un kit commerciale (RBC Bioscience, Real Genomics), seguendo le indicazioni del produttore. L'amplificazione del DNA virale è stata eseguita mediante una tecnica di RT-PCR (Olvera et al., 2004). Per valutare il grado di omologia con il genoma del ceppo di PCV2b utilizzato, è stato sequenziato il DNA virale amplificato di 17 campioni di tessuto (sia di tessuto linfoide sia del tratto riproduttivo), scelti in modo casuale tra quelli risultati positivi all'RT-PCR. Il genoma virale è stato nuovamente estratto come descritto in precedenza e i prodotti di PCR sono stati amplificati secondo il metodo descritto da Ouardani et al. (1999). I prodotti di amplificazione dell'ORF2 sono stati sequenziati e comparati con le sequenze di riferimento depositate in Genbank (PCV2a AF465211; PCV2b HM038022.1) e con quella del ceppo utilizzato per l'infezione (PCV2b 6503, IZS – Brescia – Italy). Il Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) è stato utilizzato per determinare il grado di omologia delle sequenze, sulla base di un criterio di similarità del 98%.

Campioni ematici del giorno -2 e del giorno della soppressione sono stati esaminati mediante metodiche RT PCR per la ricerca del genoma di PRRSV, ADV e PPV rispettivamente secondo le metodiche di Bonilauri et al., 2003; Katz e Petersen, 1992; Kim et al., 2001.

Indagine istologica ed immunoistochimica

I campioni fissati in formalina sono stati inclusi in paraffina e, sezioni di 4 μ , sono state usate per la colorazione con ematossilina-eosina e per l'indagine immunoistochimica. Quest'ultima è stata eseguita solo sui campioni di tessuto che all'RT-PCR presentavano un valore di copie di genoma/g $> 10^8$. È stato impiegato l'anticorpo monoclonale anti PCV2 clone F217, secondo la tecnica descritta da Sarli et al., 2012.

Analisi statistica

Sono state valutate le seguenti variabili: media dei titoli anticorpali anti PCV2; proporzione di campioni risultati positivi alla ricerca del genoma virale di PCV2; quantità di virus (espressa come numero di copie di genoma virale di PCV2/g) nei campioni esaminati. I confronti sono stati eseguiti utilizzando il test U di Mann-Whitney per le variabili quantitative e il test chi-quadrato per quelle qualitative. La valutazione preliminare della normalità della distribuzione campionaria è stata eseguita utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnoff. Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il software SPSS ver. 19.

RISULTATI

Osservazioni cliniche

Al giorno 0 tutte le scrofe hanno evidenziato il riflesso di immobilità e chiari segni di estro. Nei giorni successivi all'inseminazione artificiale non è stato rilevato nessun sintomo estrale. Tre animali (NV5, V3 e V4) hanno abortito, rispettivamente, a +20, +22 e +24 GPIA. Le scrofette V1, V5, V6, NV3, NV4 e NV6 sono risultate gravide all'esame ecografico eseguito a 29 giorni. Negli animali non gravidi o che avevano abortito, i valori di P4 sono diminuiti rapidamente fino a raggiungere la concentrazione di $1,35 \pm 1,75$ ng/ml a +21

GPIA. Al contrario, i valori di P4 negli animali gravidi sono rimasti costantemente elevati ($18,60 \pm 5,28$ ng/ml a 21 GPIA).

Gli animali non gravidi sono stati sacrificati ai seguenti giorni: +34 (V2), +23 (V3), +25 (V4), +33 (NV1 e NV2), e +22 (NV5). Le scrofette gravide sono state sacrificate rispettivamente: +54 (V1), +49 (V5), +50 (V6), +51 (NV3), +49 (NV4), +55 GPIA (NV6).

Sierologia

A inizio sperimentazione tutte le scrofe erano sieropositive per PCV2. A -2, +7, +21 e +28 GPIA nessuna differenza statisticamente significativa ($P > 0,05$) è stata osservata nella media dei titoli anticorpali anti PCV2 dei due gruppi di soggetti (NV e V). A +35 GPIA la media del titolo anticorpale anti PCV2 dei soggetti del gruppo NV è risultata significativamente più alta di quella del gruppo V (M-W U test= $-2,32$; $p=0,019$) (Fig. 1).

Non sono stati messi in evidenza incrementi dei titoli anticorpali anti PRRSV, PPV e ADV tra il giorno -2 e il giorno dell'eutanasia; tutti i soggetti sono risultati costantemente negativi alla ricerca di anticorpi anti gE di ADV.

Indagini virologiche

Tutti i campioni individuali di siero prelevati a inizio e fine sperimentazione hanno dato esito negativo alla ricerca del genoma di PRRSV, ADV e PPV. Il DNA di PCV2 è stato messo in evidenza nei campioni di siero prelevati a -2 GPIA da 4 soggetti (NV2, NV3, NV5, NV6).

Negli animali del gruppo NV è stata osservata la maggiore proporzione di campioni ematici positivi alla ricerca del genoma di PCV2 (21 positivi su 37 esaminati: 56,7%). Al contrario, i soggetti del gruppo V sono risultati raramente viremici (2 campioni positivi su 36: 5,5%). La proporzione di campioni ematici positivi è risultata statisticamente più elevata nel gruppo NV (Chi-quadrato= $21,55$; $p<0,001$).

Considerando i risultati complessivi della ricerca del genoma di PCV2 dai tamponi nasali, vaginali e rettali, nel gruppo NV è stata evidenziata la più alta proporzione di campioni positivi (92 su 129 esaminati: 71,3%) rispetto a quelli provenienti dal gruppo V (31 su 126 esaminati: 24,6%) (Chi-quadrato= $53,85$; $p<0,001$).

Considerando le diverse tipologie di tamponi (vaginali, rettali, nasali) nei soggetti del gruppo NV, la proporzione di positività è stata sempre significativamente superiore ($p<0,001$) rispetto a quella del gruppo V (Tab. 1).

Nel tessuto linfoide i campioni provenienti del gruppo NV hanno presentato percentuali di tessuti positivi e quantità di genoma virale (numero di copie genoma/g determinate mediante real time PCR) significativamente maggiori ($p<0,001$) di quelli del gruppo V.

Valutando la proporzione di tessuti linfoidi positivi a 29 giorni (per i tessuti campionati dai soggetti non gravidi o che avevano abortito) e a 53 giorni (soggetti gravidi) è stata evidenziata una riduzione statisticamente significativa nel solo gruppo V (Fig. 2). Tuttavia, in entrambi i gruppi, la quantità di genoma virale presente nei distretti linfoidi a 53 giorni è statisticamente inferiore ($p<0,001$) rispetto a quella presente a 29 giorni.

Tabella 1: Eliminazione di PCV2 e viremia. Confronto numerico (assoluto) e proporzionale (relativo) della positività/negatività dei tamponi rettali, vaginali, nasali, e dei campioni ematici per la ricerca PCV2 in ciascuno dei due gruppi.

Table 1: PCV2 shedding and viremia. Comparison of the numeric (absolute) and percentage (relative) of rectal, vaginal and nasal swabs and of blood samples data on PCV2 assessment in the two groups.

Campione	Gruppo	Campioni positivi(%)		Campioni negativi (%)		Totale
tamponi fecali	V	12	(28,6)	30	(71,4)	42
	NV	38	(88,4)	5	(11,6)	43
	totale	50	(58,8)	35	(41,2)	85
tamponi vaginali	V	6	(14,3)	36	(85,7)	42
	NV	25	(58,1)	18	(41,9)	43
	totale	31	(36,5)	54	(63,5)	85
tamponi nasali	V	13	(31,0)	29	(69,0)	42
	NV	29	(67,4)	14	(32,6)	43
	totale	42	(49,4)	43	(50,6)	85
sangue	V	2	(5,7)	33	(94,3)	35
	NV	21	(56,8)	16	(43,2)	37
	totale	23	(68,1)	49	(31,9)	72

Nei tessuti delle vie genitali (feti compresi, se presenti) si è osservato lo stesso risultato, ovvero percentuale di tessuti positivi e titolo virale significativamente ($p < 0,001$) più basso nel gruppo dei soggetti V i quali, va precisato, hanno presentato positività alla ricerca del genoma virale nelle placente nel 39% dei casi vs il 77% nel gruppo NV. Un solo feto, proveniente da una scroffetta del gruppo NV, è risultato positivo.

Il sequenziamento ha permesso di rilevare la presenza del ceppo utilizzato per l'infezione in un caso (segmento uterino adiacente al feto 11 della scroffetta V5), mentre gli altri 16 amplificati erano omologhi alle sequenze di riferimento per PCV2a.

Figura 1. Media dei titoli anticorpali anti PCV2 (log 6) per gruppo. A +14 GPIA non è stato eseguito il prelievo ematico per non interferire con il riconoscimento materno di gravidanza.

Figure 1: Mean antibody titers to PCV2 (log 6) per group. On +14 GPIA the blood was not collected in order to do not interfere with the maternal recognition of pregnancy.

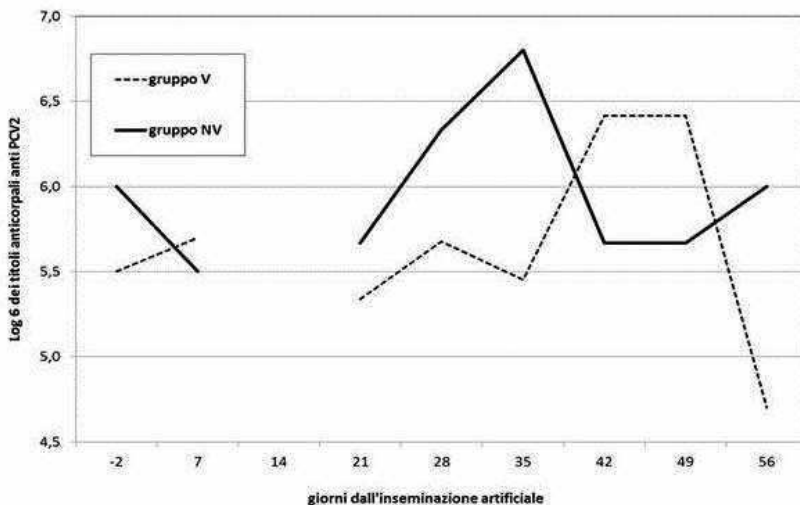
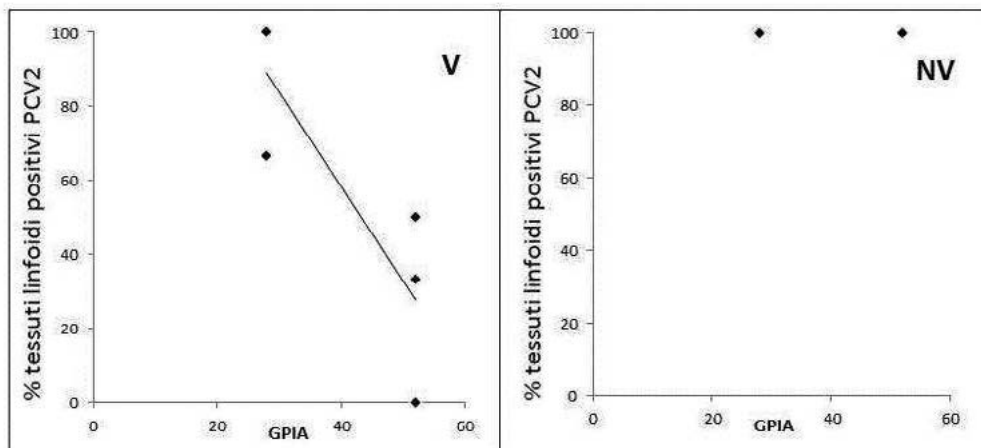


Figura 2: Clearance del PCV2. Variazione del PCV2 nei distretti linfoidi nel corso del trial nei gruppi V e NV dal +29 GPIA al +53 GPIA. Sull'asse delle ordinate è riportata la percentuale dei tessuti linfoidi positivi alla ricerca di PCV2 per mezzo della RT-PCR.

Figure 2: PCV2 clearance. PCV2 clearance in the lymphoid tissues during the trial in V and NV groups, from +29 GPIA to +53 GPIA. On vertical axis the percentage of PCV2 RT-PCR positive lymphoid tissues are reported.



Anatomia patologica, indagini istopatologiche e immunoistochimiche

L'esame necroscopico ha messo in evidenza lievi lesioni polmonari, gastriche ed epatiche compatibili con quelle di norma rilevabili in suini allevati intensivamente e non riconducibili all'azione di PCV2. Il numero delle strutture funzionali ovariche è risultato coerente con il numero di feti (numero medio di corpi lutei: $15 \pm 6,6$ e $2,6 \pm 4,4$, rispettivamente negli animali gravidi e non gravidi; numero medio di corpi albicanti nei soggetti non gravidi: $6,4 \pm 3,5$). Gli uteri dei soggetti non gravidi presentavano caratteristiche infantili.

Nei feti non sono state osservate lesioni macroscopiche e le dimensioni sono risultate compatibili con l'età gestazionale. Il numero dei feti è stato: 3, 15, 9, 10, 16, 14 rispettivamente delle scrofette V1, V5, V6, NV3, NV4 e NV6.

L'esame istopatologico non ha messo in evidenza lesioni riconducibili a PCVDs; solo in 6 campioni di tessuto linfoide (tonsille e linfonodi) provenienti dalle scrofette NV1 e NV2 sono stati identificate positività immunoistochimiche per PCV2 in rari istiociti e cellule dendritiche follicolari.

DISCUSSIONE

Nel presente lavoro, scrofe convenzionali vaccinate (V) e non vaccinate (NV) nei confronti di PCV2 sono state inseminate con seme addizionato con una sospensione virale di PCV2b. Tutti gli animali sono risultati negativi alla ricerca di ADV, PPV e PRRS e non hanno sierconvertito nei confronti di questi patogeni potenzialmente in grado di determinare turbe riproduttive nella scrofa.

La proporzione di campioni prelevati sia in vivo sia post-mortem e risultati positivi alla ricerca di PCV2 è stata significativamente inferiore nel gruppo dei soggetti vaccinati. Analogamente, anche la quantità di virus presente nei campioni esaminati è risultata inferiore nel gruppo di soggetti vaccinati. Queste evidenze confermano il fatto che la vaccinazione, pur non impedendo l'infezione, è in grado di ridurre in modo significativo la quantità di virus eliminato dagli animali, le possibilità di replicazione dello stesso all'interno dell'organismo, la quantità di eventi viremici e, di conseguenza, le probabilità di trasmissione ai feti dell'infezione. Tali osservazioni permettono di ipotizzare che, in condizioni di campo (anche su soggetti sieropositivi e/o infetti), la vaccinazione sia efficace sia in termini di prevenzione del danno ai prodotti del concepimento sia in termini di riduzione della quantità di virus eliminato nell'ambiente riducendo così il rischio di trasmissione orizzontale alle scrofe e ai suinetti neonati.

Per quanto riguarda le vie di escrezione esaminate, si osserva come l'eliminazione fecale, che è una delle più importanti vie di escrezione, subisca una significativa riduzione nei soggetti vaccinati. Ciò ha importanti conseguenze epidemiologiche in considerazione del fatto che questa via è responsabile del mantenimento e dell'endemizzazione dell'infezione all'interno dei gruppi di scrofe.

Il titolo sierologico anti PCV2 è aumentato dopo l'infezione, raggiungendo la concentrazione massima a 35 e 42 giorni, rispettivamente nel gruppo NV e V. La diversa cinetica di produzione anticorpale nei 2 gruppi potrebbe anch'essa essere la conseguenza della maggiore circolazione virale nel gruppo NV con conseguente maggiore e più precoce stimolazione anticorpale. Non esistono dati simili in letteratura per il confronto in quanto, nelle prove sperimentali, si impiegano sempre animali non immuni o con bassissimo titolo sierologico,

quindi con notevoli divergenze tra soggetti vaccinati e non vaccinati. Comunque in una indagine (Madson et al., 2009a) il confronto tra i titoli anticorpali di un gruppo vaccinato e l'altro non vaccinato, entrambi infettati con PCV2, non dimostrò differenze di cinetica anticorpale (IgG totali) tra i 2 gruppi confrontati a partire dal 56 giorno di gestazione.

I dati ottenuti suggeriscono anche che la ridotta eliminazione di PCV2 nei soggetti V possa dipendere da una ridotta cinetica virale nei tessuti linfoidi che notoriamente rappresentano la più favorevole sede di replicazione virale. Circa la presenza del PCV2 nei tessuti linfoidi, è possibile evidenziare che, nei soli soggetti del gruppo V, la durata dell'eliminazione è inferiore, così come emerge dal confronto dei risultati della ricerca del genoma virale effettuata a 29 e 53 GPIA. In entrambi i gruppi, a 29 giorni la proporzione di campioni di tessuto linfoide positivi è identica ed estremamente elevata (100%); a 53 GPIA tale percentuale resta invariata nel gruppo NV (100%), mentre si riduce in maniera significativa al 58,33% nei soggetti V.

In nessun feto delle scrofe del gruppo V è stato messo in evidenza il genoma di PCV2, ma osservazioni interessanti emergono circa le percentuali di positività della placenta. Il virus si localizza a livello placentare contestualmente ad un episodio viremico, e la bassa percentuale di viremia nei soggetti V ha verosimilmente condizionato la più bassa positività placentare nei soggetti di questo gruppo (39%) nel confronto con quelli NV (77%).

I risultati del sequenziamento confermano a) la possibilità di co-infezione PCV2a/PCV2b (Zhai et al., 2011) almeno in alcuni dei campioni esaminati e, b) l'elevata percentuale di identità del genoma di PCV2b identificato rispetto a quello utilizzato per l'infezione. L'esperimento è stato condotto in scrofe convenzionali per simulare il più fedelmente possibile l'effetto del vaccino in condizioni di campo e, già da prima dell'infezione (-2 GPIA), alcuni soggetti erano viremici per PCV2, oltre ad essere, tutti, sierologicamente positivi. La messa in evidenza nei campioni esaminati, del genoma del ceppo di PCV2b utilizzato per l'infezione dimostra la possibilità di indurre sperimentalmente una co-infezione in soggetti già positivi per PCV2a e, in ogni caso, questa che può verosimilmente accadere anche in condizioni di campo. Va tuttavia sottolineato che, non avendo realizzato il clonaggio del DNA virale, non è possibile escludere la presenza in basse quantità del genoma di PCV2b anche nei campioni risultati positivi al solo PCV2a.

Dallo studio condotto si può concludere che la profilassi vaccinale, oltre a limitare la trasmissione verticale, riduce lo shedding virale e dunque la trasmissione orizzontale anche in scrofe convenzionali sieropositive.

BIBLIOGRAFIA

- Almond GW, Flowers WL, Batista L, D'Allaire S. (2006) "Diseases of the reproductive system" in: *Disease of Swine 9th Ed.* Blackwell Publishing.
- Bonilauri P, Guazzetti S, Barbieri G, Casali M, Franchi L, Luppi A, Calzolari M, Merialdi G, Dottori M., (2003) Longitudinal study of PRRSV infection in 6 breeding herds by ELISA-antibody test and serum pooled PCR. In: *Proc. of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases.* Rome, 29 June-2 July 2003, 98-99.
- Cariolet R, Blanchard P, Le Dimma M, Mahé D, Keranflec'h A, Julou P, Beaurepaire B, De Boissésou C, Troung C, Jestin A (2001) "Consequences of PCV2 experimental infection of non-immune SPF sows using the intra-uterine route". In *Proceedings of Congress on ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: 2001*; Saint Malo, France, 129.

- Hansen MS, Hjulsgaard CK, Bille-Hansen V, Haugegaard S, Dupont K, Høgedal P, Kunstmann L, Larsen LE (2010) "Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures". *Vet Microbiol.*, 144(1-2), 203-9.
- Harding JC (2004) "The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2". *Vet Microbiol.*, 98(2), 131-135.
- Hesse R, Kerrigan M, Rowland RR (2008) "Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field". *Virus Res.*, 132:201–207.
- Katz JB, Pedersen JC (1992) "Molecular analysis of pseudorabies viral vaccines and their rapid differentiation from wild-type isolates using DNA-amplified glycoprotein I and thymidine kinase gene segment polymorphisms". *Biologicals* , 20:187-195.
- Kim J, Choi C, Han DU, 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.
- Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, and Chae C (2004) "Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs". *Can J Vet Res.*, 68(3): 218–221.
- Madson DM, Opriessnig T (2011) "Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination". *Anim Health Res Rev.* 12(1), 47-65.
- Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. (2009) "Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2". *Vet Pathol.*, 46(4):707-716.
- Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. (2009a) "Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of the dam on PCV2 replication in utero. *Clin and Vacc Immunol.* 16(6): 830-834.
- Morandi F, Ostanello F, Fusaro L, Bacci B, Nigrelli A, Alborali L, Dottori M, Vezzoli F, Barigazzi G, Fiorentini L, Sala V, Leotti G, Joisel F, Sarli G (2010) "Immunohistochemical detection of aetiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in Italian pigs." *J Comp Pathol.* 142(1), 74-78.
- Nechvatalova K, Kudlackova H, Leva L, Babickova K, Faldyna M (2011) "Transfer of humoral and cell-mediated immunity via colostrum in pigs". *Vet Immunol Immunopathol.* 142(1-2), 95-100.
- Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, Domingo M (2004) "Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs". *J Virol Methods.* 117(1):75-80.
- Oh Y, Seo HW, 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(7), 1556-1562.
- Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG (2007) "Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies". *J Vet Diagn Invest.*, 19(6), 591-615.
- Ouardani M, Wilson L, Jetté R, Montpetit C, Dea S (1999) "Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses". *J Clin Microbiol.*, 37,3917-3924.
- Pejsak Z, Kusior G, Pomorska-Mól M, Podgórska K (2012) "Influence of long-term vaccination of a breeding herd of pigs against PCV2 on reproductive parameters". *Pol J Vet Sci.*, 15(1):37-42.
- Sarli G, Morandi F, Panarese S, Bacci B, Ferrara D, Bianco C, Fusaro L, Bacci ML, Galeati G, Dottori M, Bonilauri P, Lelli D, Leotti G, Vila T, Joisel F, Allan G, Benazzi C, Ostanello F (2012) "Reproduction in porcine circovirus type 2 (PCV2) seropositive gilts inseminated with PCV2b spiked semen". *Acta Vet Scand.*, 54:51

- Segalés J (2012) "Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis." *Virus Res.*, 164(1-2), 10-19.
- 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, 357-64.
- West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA (1999) "Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2". *J Vet Diagn Invest.*, 11(6),530-2.
- Zhai SL, Chen SN, Wei ZZ, Zhang JW, Huang L, Lin T, Yue C, Ran DL, Yuan SS, Wei WK, Long JX (2011) "Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. *Virol J.*13(8):517.