

VALIDAZIONE ED APPLICAZIONE DI UN PROTOCOLLO BASATO SU DIRECT PCR PER LA RICERCA DI MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE E PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3

VALIDATION AND APPLICATION OF A DIRECT PCR PROTOCOL FOR THE DETECTION OF MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE AND PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3

LEGNARDI, M., FRANZO, G., CECCHINATO, M., TUCCIARONE, C. M., DRIGO, M.

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) - Università di Padova

Parole chiave: *Porcine circovirus type 3; Mycoplasma hyopneumoniae; direct PCR;*

Key words: *Porcine circovirus type 3; Mycoplasma hyopneumoniae; direct PCR;*

Riassunto: Una metodica basata su *direct PCR*, in grado di garantire l'amplificazione di DNA direttamente a partire da campioni non purificati, è stata validata per la ricerca di *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Porcine circovirus type 3* (PCV3). I microorganismi scelti rappresentano due realtà epidemiologiche profondamente diverse: mentre il primo è un batterio a tropismo respiratorio storicamente responsabile di gravi danni economici per la produzione suinicola mondiale e la cui letteratura in merito è molto ampia, PCV3 è un virus di recentissima scoperta, ancora poco conosciuto ma caratterizzato da molti punti di contatto con il ben più noto *Porcine circovirus type 2* (PCV2), uno dei patogeni più rilevanti ad affliggere il settore.

La validazione dei rispettivi protocolli ha fornito un utile strumento per lo svolgimento di analisi molecolari fortemente vantaggiose sia a livello di tempo che di costi, il tutto garantendo alte prestazioni diagnostiche in termini di specificità, sensibilità e ripetibilità. L'applicazione della metodica in un contesto di campo ha inoltre permesso di estrapolare numerosi dati sull'epidemiologia di Mhyo e PCV3, in particolare inerenti la loro circolazione nel territorio italiano, il fenomeno delle coinfezioni, la loro eventuale associazione con determinati sintomi clinici e lesioni, le matrici nelle quali è possibile rinvenirli e le categorie produttive che risultano più colpite. Se per quanto riguarda Mhyo le informazioni raccolte non fanno che confermare dati pregressi, le indicazioni tratte in merito a PCV3, *in primis* quelle relative alla sua presenza in Italia, gettano promettenti basi per futuri studi atti a determinare l'esatto ruolo epidemiologico di questo microrganismo emergente.

Abstract: A *direct PCR*-based protocol allowing DNA amplification from unpurified samples has been validated to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) and *Porcine circovirus type 3* (PCV3). These two microorganisms represent radically different epidemiological situation: while the first is a well-known respiratory bacterial pathogen, which accounts for huge economic losses, PCV3 is a newly discovered and still obscure virus sharing some similarities with the infamous *Porcine circovirus type 2* (PCV2), one of the most devastating pathogens afflicting the pig industry.

The assay validation has provided a useful tool to perform quick and cost-effective molecular analyses featured by high sensibility, sensitivity and repeatability.

After validation, the two protocols have been applied to investigate Italian field samples, thus providing several data on the epidemiology of PCV3 and Mhyo, especially regarding their circulation, distribution in different age groups, possible association with clinical symptoms and necropsy findings, detection in diverse diagnostic matrices and coinfections with other pathogens.

The data collected on Mhyo mostly agree with the vast already available literature. On the other hand, the information gathered on PCV3 give useful insights into its largely unknown epidemiology and lay the foundations for future works that will be necessary to clarify the exact pathogenetic role of this emerging microorganism.

INTRODUZIONE

L'industria suinicola rappresenta il settore leader nella produzione di carne a livello mondiale, europeo ed italiano (<http://www.fao.org/faostat>). Essa è in rapida e costante espansione (anche e soprattutto nei paesi in via di sviluppo) ed è caratterizzata da sistemi produttivi marcatamente intensivi ed elevati livelli tecnologici, oltre che da una grande mole di scambi internazionali. Nonostante nei paesi sviluppati l'applicazione di misure di biosicurezza sia una pratica comune, i danni economici causati dalle malattie infettive sono devastanti e si riscontra un numero allarmante di patologie emergenti (Fournié et al., 2015). Le alte densità di popolazione e l'omogeneità genetica tipica del suino offrono un substrato ideale per la selezione di agenti virali spiccatamente patogeni e ospite-specifici, spesso responsabili di epidemie su larghissima scala (Drew, 2011) è il caso ad esempio di *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) e di *Porcine circovirus type 2* (PCV2).

In un simile contesto, i saggi basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) rappresentano un ausilio diagnostico di inestimabile importanza, al tempo stesso performante e di facile applicazione nella pratica laboratoristica quotidiana. Nel corso degli ultimi 25 anni, la PCR classica e le sue varianti (come PCR *multiplex* e *nested*, ma soprattutto la PCR *real-time*) si sono affermate, grazie alla loro elevata sensibilità, come le metodiche molecolari di scelta in una grande varietà di ambiti di competenza veterinaria, non limitati strettamente alla sanità animale ma con implicazioni anche per la salute umana (basti pensare all'igiene degli alimenti ed alle zoonosi). Tra i più recenti sviluppi in tal senso figura la *direct PCR*, la quale permette l'amplificazione del DNA a partire direttamente dal campione, non richiedendo una fase preliminare di estrazione dell'acido nucleico e garantendo nel contempo buone prestazioni e un significativo risparmio a livello economico e di tempo necessario per lo svolgimento delle analisi.

L'obiettivo primario di questo progetto è stato la validazione di protocolli basati su *direct PCR* per la ricerca di patogeni rilevanti in ambito suinicolo. La scelta dei microorganismi da studiare è ricaduta su *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Porcine circovirus type 3* (PCV3), ritenuti rappresentativi di due situazioni epidemiologiche notevolmente differenti.

Mhyo è un eubatterio appartenente alla classe *Mollicutes*, ordine *Mycoplasmatales*, famiglia *Mycoplasmataceae*. Si tratta di un patogeno strettamente ospite-specifico che rappresenta l'agente eziologico principale della polmonite enzootica, un'affezione respiratoria del suino diffusa a livello mondiale e caratterizzata da andamento cronico, eziologia multifattoriale, alta morbilità e bassa mortalità (Thacker and Minion, 2012). Sebbene possa colpire suini di tutte le età, essa è difficilmente osservata in individui sotto le 6 settimane di vita. I sintomi includono una tosse secca non produttiva cronica, una riduzione dell'accrescimento giornaliero ed un peggioramento dell'indice di conversione alimentare; in forme complicate si possono aggiungere piresia, dispnea, prostrazione e anoressia, con esiti talvolta mortali (Maes et al., 1996): Mhyo è infatti considerato un vero e proprio "door-opener" per un gran numero di patogeni secondari, tra i quali figurano *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* e *Arcanobacter pyogenes* (Thacker and Minion, 2012). Mhyo gioca inoltre un ruolo chiave nel complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC), il quale colpisce tipicamente i soggetti in accrescimento ed in finissaggio causando tosse, dispnea, anoressia, febbre e riduzione dell'accrescimento giornaliero (Chae, 2016; Sibila et al., 2009). Mhyo è quindi responsabile di ingenti perdite economiche per la suinicoltura mondiale, adducibili principalmente ad uno scadimento delle prestazioni produttive, oltre che a maggiori costi veterinari ed in rari casi ad un aumento del tasso di mortalità

(Maes et al., 1998). Le attuali misure adottate per controllare la polmonite enzootica, che consistono solitamente nel combinare un management ottimale all'uso di antimicrobici ed alla vaccinazione, non sono considerate in grado di debellare la malattia, per quanto i benefici a livello economico siano indubbi (Simionatto et al., 2013).

Se quindi la centralità di Mhyo nell'eziopatogenesi delle affezioni respiratorie del suino ed il suo conseguente impatto economico sul settore sono ben documentate, profondamente diverso è il caso di PCV3, la cui scoperta, avvenuta per mezzo di analisi metagenomiche, è recentissima (Palinski et al., 2017). Si tratta della terza specie appartenente al genere *Circovirus* (Figura 1) in grado di infettare il suino dopo *Porcine circovirus type 1* (PCV1) e PCV2. Mentre l'importanza dell'apatogeno PCV1 è marginale (Puvanendiran et al., 2011; Tombácz et al., 2014) a partire dagli anni '90 PCV2 è emerso come uno dei principali patogeni ad affliggere la produzione suinicola mondiale, causa di ingentissime perdite economiche dovute ad un complesso di malattie descritte collettivamente come *Porcine circovirus associated disease* (PCVAD) (Alarcon et al., 2013; Meng, 2012). Per quanto riguarda PCV3, le conoscenze sulla sua epidemiologia sono ancora limitate. Descritto sinora in Cina (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Shen et al., 2017) Stati Uniti (Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016) Corea (Kwon et al., 2017) e Polonia (Stadejek et al., 2017) questo virus è già stato associato a diverse manifestazioni cliniche tra cui disordini riproduttivi, miocarditi, infiammazioni multisistemiche, sindromi dermatite-nefrite e respiratorie, anche se non è ancora stato chiarito il suo esatto ruolo patogenetico, sia esso presente da solo o in coinfezione (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016; Shen et al., 2017). Per questi motivi, e soprattutto per via dei molti punti di contatto con il ben più noto PCV2, l'importanza epidemiologica di PCV3 è potenzialmente notevole ma ancora tutta da provare: risulta in tal senso evidente la necessità di strumenti diagnostici al contempo performanti e di facile accessibilità, a cui si è per l'appunto cercato di rispondere con questo progetto.

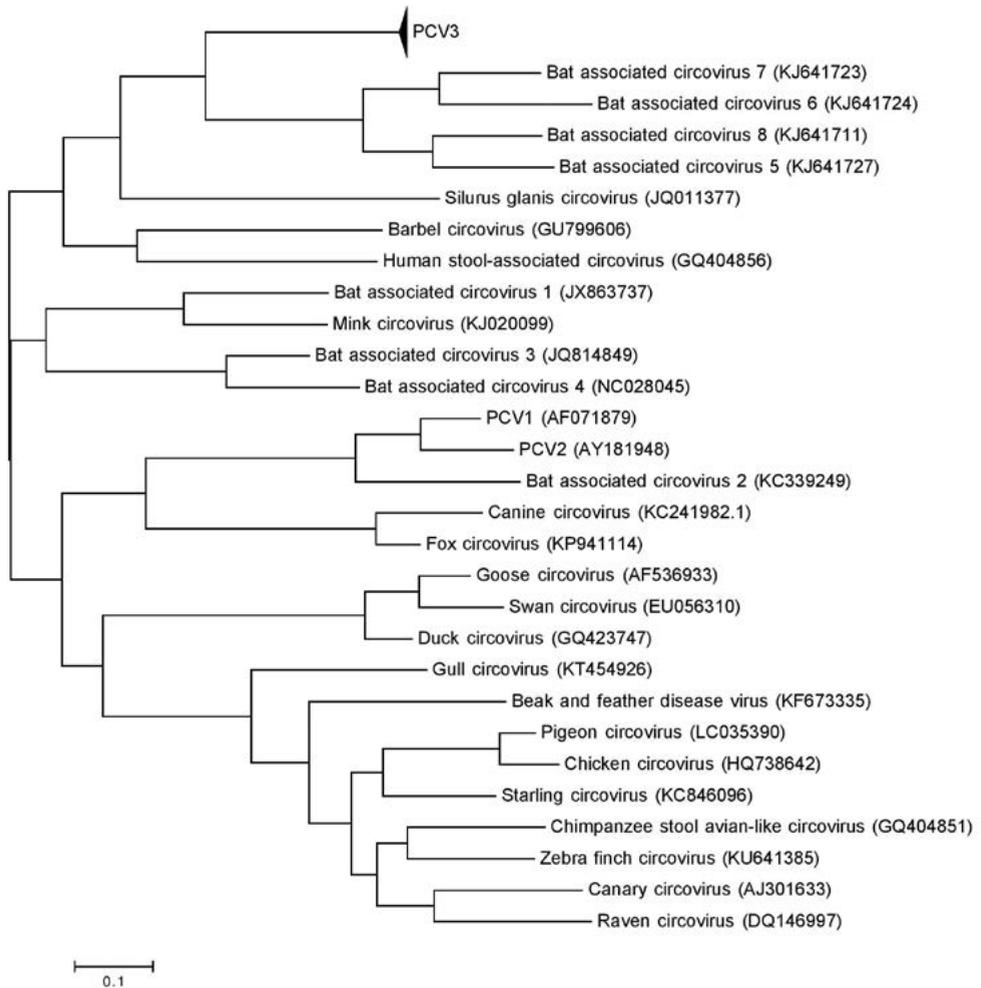


Figura 1. Albero filogenetico del genere *Circovirus*, costruito applicando l'approccio di *Maximum Likelihood*, basato sul modello Tamura-Nei ed implementato nel software MEGA7 (Kumar et al., 2016) L'allineamento di partenza è stato ottenuto utilizzando il programma MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/#ref>) su sequenze preprocessate con il tool *Cyclic DNA Sequence Aligner* (<http://kdbio.inesc-id.pt/~csa/index.php>).

Figure 1. Phylogenetic tree of the *Circovirus* genus, built using the *Maximum Likelihood* method, based on Tamura-Nei model, as implemented in MEGA7 software (Kumar et al., 2016) The starting alignment was obtained with MAFFT software (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/#ref>) starting from sequences that were preprocessed with *Cyclic Dna Sequence Aligner* tool (<http://kdbio.inesc-id.pt/~csa/index.php>).

A validazione avvenuta, il passo successivo è consistito nell'effettiva applicazione del protocollo su campioni provenienti da diverse realtà suinicole italiane. Se da una parte la natura dei suddetti campioni, non prelevati appositamente ma provenienti da studi precedenti e già rivelatisi positivi nei confronti di altri patogeni respiratori (PRRS e PCV2 *in primis*), non ha permesso di trarre conclusioni sulla prevalenza dei microrganismi, dall'altra ciò ha consentito di estrapolare utili dati in merito al fenomeno delle coinfezioni, le quali giocano un ruolo determinante nelle meccaniche patogenetiche di Mhyo e la cui importanza per quanto riguarda PCV3 necessita di essere chiarita con ulteriori ricerche. Un'ulteriore ragione di grande interesse era rappresentata dalla possibilità di attestare la presenza di PCV3 sul territorio italiano. Tra gli aspetti indagati figurano anche la frequenza di PCV3 e Mhyo nelle diverse categorie produttive, i sintomi e le lesioni necroscopiche a cui sono associati, la loro diffusione nel Norditalia e i materiali biologici in cui possono essere ritrovati.

MATERIALI E METODI

Non essendo ad oggi disponibile nessun isolato di PCV3, come controllo positivo è stato utilizzato un plasmide sintetico contenente l'intera sequenza del virus, gentilmente concessa dal prof. Hause (Kansas State University). Nel dettaglio, il genoma completo di PCV3 è stato fatto sintetizzare chimicamente e clonare in un plasmide vettore (pUC57-Kan Vector) da una ditta specializzata (GenScript). Con il costrutto così ottenuto sono stati trasformati degli *E. coli* Top10 competenti (Invitrogen). Al fine di ottenere un controllo che emulasse la presenza del virus all'interno delle cellule dei tessuti animali, una sospensione contenente 10^5 *E. coli*/mL è stata ulteriormente diluita 1:100 in una matrice ottenuta dall'omogeneizzazione di polmone suino in PBS. Il controllo positivo di Mhyo è stato cortesemente fornito dal dottor Catania dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

Diverse coppie di *primer* sono state disegnate utilizzando il programma *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), per poi selezionare quelle più performanti attraverso prove sperimentali. La specificità degli oligonucleotidi è stata preliminarmente valutata mediante *Primerblast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>), mentre l'impiego del software *OligoAnalyzer 3.1* (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) ha permesso di accertare che la complementarietà fra i *primer* fosse bassa, scongiurando così l'insorgere di problemi legati alla struttura secondaria come la formazione di *hairpin*, omodimeri ed eterodimeri. Particolare attenzione è stata posta alla posizione di *annealing* dei primer di PCV3, per fare in modo che corrispondesse alla regione codificante la proteina *Rep*, in quanto molto conservata (Rosario et al., 2017).

I dati relativi ai primer sono elencati in Tabella 1.

PRIMER	SEQUENZA	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
Mhyo forward	5'-AACAAATATGGAGAATTGGTCGGAAG-3'	453 bp
Mhyo reverse	5'-CCCCTAATTAATAAAATTGGGACGTG-3'	
PCV3 forward	5'-AAAGCCCCGAAACACAGGTGGTGT-3'	510 bp
PCV3 reverse	5'-TTTTCCCGCATCCTGGAGGACCAAT-3'	

Tabella 1. *Primer* utilizzati per l'amplificazione di Mhyo e PCV3.

Table 1. *Primers used to amplify Mhyo and PCV3.*

La lunghezza degli amplificati così ottenuti, rispettivamente di 510 bp per PCV3 e di 453 bp per Mhyo, è stata scelta con l'obiettivo di ottenere un compromesso tra l'efficienza della reazione di PCR e la possibilità di svolgere sequenziamenti che risultassero informativi.

Per l'amplificazione è stato utilizzato il kit *Phire™ Animal Tissue Direct PCR* (Thermo Scientific), il quale può essere impiegato seguendo due diversi protocolli, uno diretto che prevede la sola reazione di PCR ed uno in cui prima della PCR il campione viene diluito e sottoposto ad una preprocessazione atta a liberare il DNA dal tessuto. Sebbene la seconda soluzione vada in parte a limitare i vantaggi garantiti dalla *direct PCR* in termini di tempo necessario per svolgere le analisi, si è scelto quest'ultimo approccio (seppur con qualche modifica rispetto alle istruzio-

ni fornite dalla ditta produttrice) in quanto consigliato nel caso si abbia a che fare con *primer* e tipi di campioni non precedentemente testati, come per l'appunto in questo studio. Le aliquote preprocessate sono state stoccate a -20 °C.

Tutte le reazioni sono state svolte con un termociclatore *2720 Thermal Cycler*[®] (Applied Biosystems).

I prodotti di PCR, dopo l'aggiunta di un addensante (*DNA Loading Dye*[®]; Thermo Scientific), sono stati caricati su gel di agarosio 2% addizionato con *EuroSafe Nucleic Acid Staining Solution*[®] (EuroClone S.p.A.). La specificità delle bande è stata valutata tramite il confronto con *GeneRuler 100bp DNA Ladder*[®] (Thermo Scientific), una miscela di frammenti di DNA di peso molecolare e concentrazione noti, caricati assieme ai campioni sperimentali. La corsa elettroforetica ha previsto l'applicazione di una differenza di potenziale pari a 100V per 30 minuti. Il gel è stato quindi analizzato con un transilluminatore *Gel Doc XR System*[®] (Bio-Rad) e visualizzato con *Image Lab*[™] Software (Bio-Rad).

La fase di effettiva analisi dei campioni è stata preceduta dalla validazione dei protocolli da utilizzare. Dopo aver testato numerose impostazioni differenti a livello termico e di concentrazione di reagenti e campioni, sono stati definiti due protocolli distinti per PCV3 e Mhyo capaci di garantire prestazioni ottimali

La sensibilità analitica di ciascun metodo è stata definita effettuando delle diluizioni seriali in base 10 di controlli positivi a titolo noto e testandole con i protocolli validati. Le performance diagnostiche dei protocolli basati su *direct PCR* sono state comparate con quelle dei loro analoghi applicati dopo estrazione del DNA con metodi tradizionali.

La specificità dei due saggi è stata valutata testando sia ceppi di riferimento di altri patogeni sia campioni diagnostici risultati positivi a numerosi altri patogeni con genoma a DNA, ed in particolare: PCV1, PCV2, *Porcine parvovirus 1*, *Porcine parvovirus 2*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Corinebacterium pyogenes* e *Bordetella bronchiseptica*.

La ripetibilità è stata determinata testando sei replicati di tre diverse diluizioni di ciascun controllo positivo in 3 corse indipendenti.

Una volta ultimata la validazione, si è proceduto conducendo la ricerca di Mhyo e PCV3 su un totale di 120 campioni precedentemente risultati positivi per altri patogeni (respiratori e non) durante la routinaria attività diagnostica condotta da un'importante filiera produttiva del Nord Italia all'interno delle sue aziende. I campioni, conservati a -80°C, risultavano prelevati tra il 2014 ed il 2017 tra Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Piemonte e Friuli-Venezia Giulia (Figura 2), in 55 allevamenti appartenenti a diverse fasi di una filiera multisito, ed erano quindi rappresentativi di diverse categorie produttive.



Figura 2. Distribuzione geografica degli allevamenti da cui sono stati prelevati i campioni.
Figure 2. Geographic distribution of the sampled farms.

Brevemente, i campioni inclusi nello studio comprendevano: tessuto polmonare, placentare e fetale (in caso di episodi di aborto), *pool* di diversi organi, sangue, fluido orale, tamponi nasali, raschiati orofaringei e spugnette (utilizzate per il campionamento delle superfici degli automezzi per il trasporto animali).

I campioni si dividevano tra quelli prelevati nell'ambito della routinaria attività di autocontrollo, per i quali non erano disponibili dati anamnestici precisi, ed altri prelevati ai fini dello svolgimento di approfondimenti diagnostici in presenza di sospetti clinici: in questo secondo caso è stato possibile risalire alle informazioni relative alla sintomatologia clinica ed ai reperti anatomopatologici rinvenuti all'eventuale necropsopia.

Per la catalogazione dei campioni, degli esiti delle analisi condotte e dei dati già disponibili si è predisposto un database in Microsoft® Excel® contenente le seguenti voci:

- Identificativo del campione;
- Anno di raccolta;
- Identificativo della scatola per lo stoccaggio dei campioni;
- Identificativo della scatola per lo stoccaggio degli estratti;
- Risultato della PCR per la ricerca di Mhyo;
- Risultato della PCR per la ricerca di PCV3;
- Tipo di matrice del campione;
- Allevamento in cui è stato prelevato il campione;
- Comune dell'allevamento;
- Categoria produttiva dell'animale;
- Età dell'animale;
- Motivo del prelievo, se previsto all'interno di un piano di controllo routinario o effettuata sulla base di un sospetto clinico; nel secondo caso la sintomatologia è stata classificata in respiratoria, riproduttiva e sistemica (mortalità compresa);
- Presenza o meno di reperti necroscopici;
- Esiti degli esami per la ricerca di PRRSV (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di PCV2 (se disponibili);
- Quantificazione del titolo virale di PCV2;
- Esiti degli esami per la ricerca di *Swine influenza virus* (SIV) (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Streptococcus suis* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Mycoplasma hyorhinis* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Corinebacterium pyogenes* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Porcine epidemic diarrhoea virus* (PEDV) (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Bordetella bronchiseptica* (se disponibili);

L'analisi statistica dei dati ottenuti ha previsto l'impiego dei software *R* (*R Core Team, 2016*) e Microsoft® Excel®. Per tutti i test eseguiti, il livello di significatività statistica è stato fissato a $p < 0,05$.

RISULTATI

Le numerose prove sperimentali effettuate hanno permesso di definire due protocolli distinti per la ricerca di *Porcine circovirus type 3* (PCV3) e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), caratterizzati da elevata efficienza di reazione.

Una prima parte, comune ai due protocolli, prevede l'aggiunta di 20 ml di *Dilution Buffer* e 0,5 ml di *DNARelease Additive* a 2 ml di ciascun campione, la centrifugazione e l'incubazione per 5 minuti a 25 °C e per i successivi 4 minuti a 98 °C. 2 ml di questa soluzione, vengono addizionati ad una mix di reazione composta da *Phire Animal Tissue PCR Buffer 1x*, 0,6 mM di ciascun *primer*, 0,42 ml di *Phire Hot Start II DNA Polymerase* e acqua da biologia molecolare fino ad un volume finale di 20 ml.

A questo punto i protocolli termici differiscono, come illustrato in Tabella 2.

	MHYO	PCV3
INCUBAZIONE	98°C per 5'	98°C per 5'
DENATURAZIONE	98°C per 5"	98°C per 5"
ANNEALING	63°C per 7"	68°C per 7"
ESTENSIONE	72°C per 20"	72°C per 15"
NUMERO DI CICLI	45	45
ESTENSIONE FINALE	72°C per 1'	72°C per 1'

Tabella 2. Protocolli di PCR utilizzati per Mhyo e PCV3.
Table 2. PCR protocols used to amplify Mhyo and PCV3.

La sensibilità analitica si è rivelata essere pari a 6,24 copie/ml per PCV3 e 4,67 ucc/ml nel caso di Mhyo, mentre il confronto dei protocolli validati con metodiche molecolari tradizionali ha permesso di dimostrarne l'identica sensibilità analitica.

La specificità è stata invece confermata testando ceppi di referenza di diversi patogeni. In aggiunta, molti dei campioni diagnostici analizzati, pur essendo positivi nei confronti di altri microrganismi con genomi a DNA, non sono risultati positivi per Mhyo e PCV3. In una decina di campioni era inoltre già stata effettuata la ricerca di Mhyo, con risultati rivelatisi analoghi. Ad ulteriore conferma della specificità dei protocolli, il sequenziamento di due campioni trovati positivi (rispettivamente 3436 per Mhyo e 32941 per PCV3) ha dimostrato l'effettiva presenza dei microrganismi ricercati.

Le svariate prove condotte per determinare la ripetibilità dei due saggi hanno prodotto esiti concordanti nella totalità dei casi per entrambi i protocolli.

Le indagini diagnostiche eseguite su campioni a provenienza nota hanno permesso di ricavare una buona quantità di informazioni sull'epidemiologia dei microrganismi presi in esame.

Tra i 120 campioni analizzati, 36 sono risultati positivi per PCV3 e 21 per Mhyo.

In 16 dei 55 allevamenti presi in considerazione è stato ritrovato Mhyo (Figura 3), mentre quelli interessati dalla presenza di PCV3 si sono rivelati 26 (Figura 4).



Figura 3. Distribuzione geografica dei ritrovamenti di Mhyo
Figure 3. Geographic distribution of Mhyo positivities.



Figura 4. Distribuzione geografica dei ritrovamenti di PCV3.

Figure 4. Geographic distribution of PCV3 positivities.

La distribuzione delle positività per Mhyo e PCV3 nelle diverse categorie produttive è illustrata nelle Figure 5 e 6, rispettivamente.

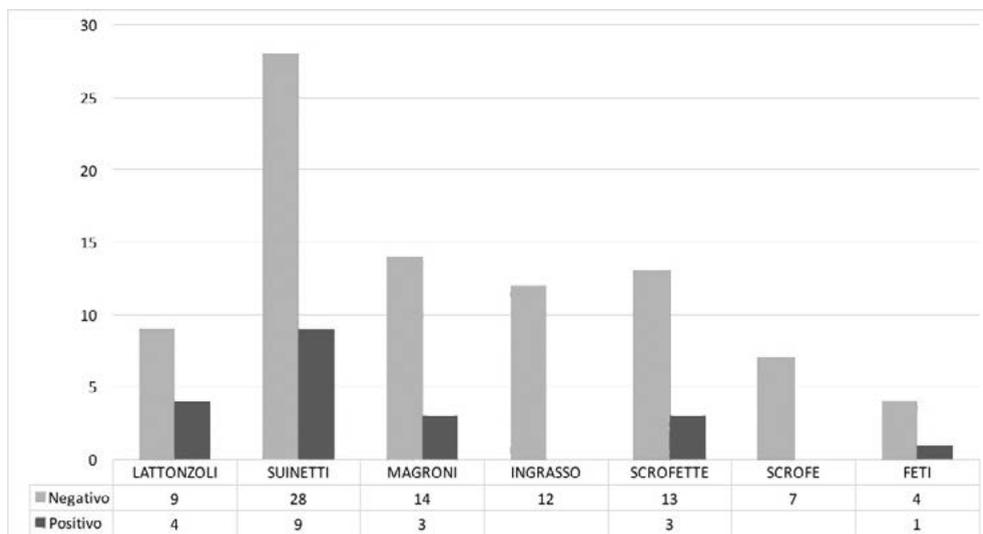


Figura 5. Conteggio degli esiti degli esami per la ricerca di Mhyo divisi per categoria produttiva.

Figure 5. Mhyo test results count classified according to the different productive categories.

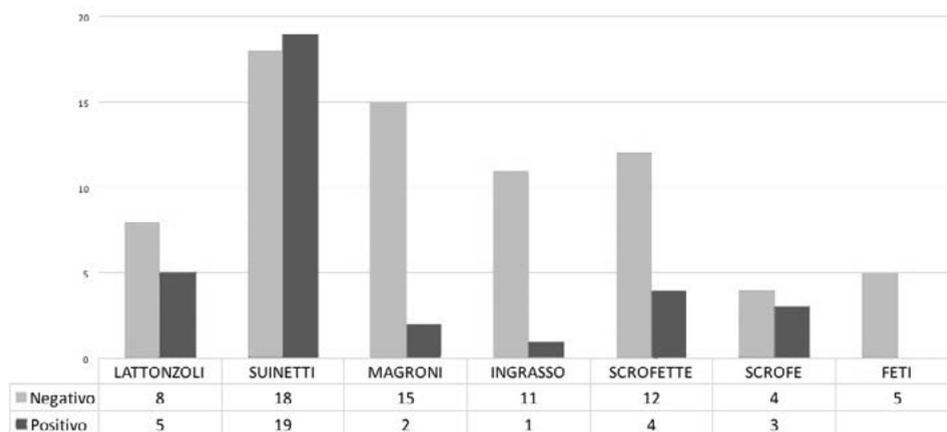


Figura 6. Conteggio degli esiti degli esami per la ricerca di PCV3 divisi per la categoria produttiva.

Figure 6. PCV3 test results count classified according to the different productive categories.

Mhyo è stato ritrovato nelle seguenti matrici: pool di organi (8/29), siero (6/33), tessuto polmonare (4/39), fluido orale (2/8) e feti abortiti (1/2).

Il rinvenimento di PCV3 è avvenuto a partire da tessuto polmonare (17/39), pool di organi (10/29), sieri (6/33), fluido orale (2/8) e tamponi nasali (1/3).

Tutte le spugnette (4 in totale), l'unica placenta e il singolo raschiato orofaringeo testati si sono rivelati negativi per entrambi i patogeni.

Mhyo è stato ritrovato in coinfezione con PCV3, PRRSV, PCV2, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyorhinis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Figura 7). Nessuno dei campioni positivi per Mhyo era stato sottoposto alla ricerca di *Corinebacterium pyogenes*, PEDV e *Bordetella bronchiseptica*.

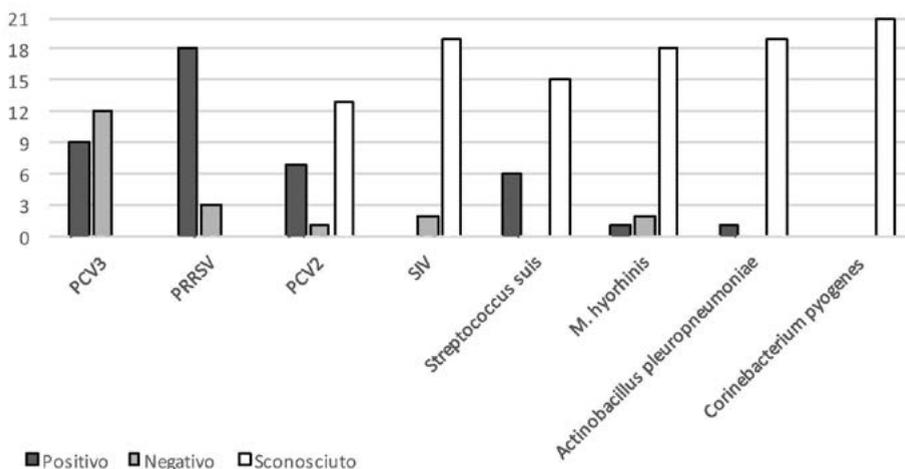


Figura 7. Conteggio degli esiti diagnostici relativi ad altri patogeni nei campioni risultati positivi alla ricerca di Mhyo.

Figure 7. Count of test results for different pathogens in Mhyo-positive samples.

PCV3 è stato ritrovato in coinfezione con Mhyo, PRRSV, PCV2, SIV, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Corinebacterium pyogenes* (Figura 8). In nessuno dei campioni positivi per PCV3 erano stati ricercati PEDV e *Bordetella bronchiseptica*.

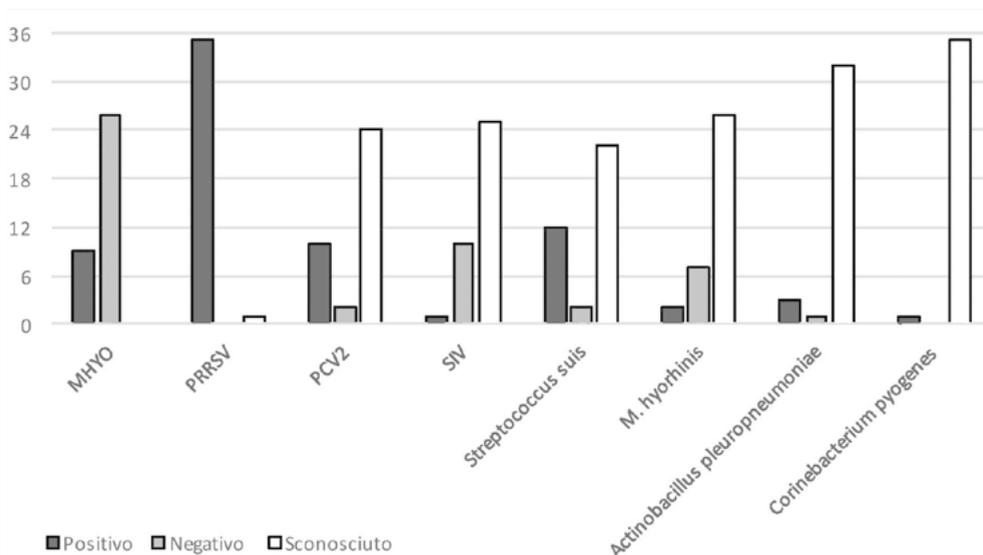


Figura 8. Conteggio degli esiti diagnostici relativi ad altri patogeni nei campioni risultati positivi alla ricerca di PCV3.

Figure 8. Count of test results for different pathogens in PCV3-positive samples.

La positività per Mhyo è stata riscontrata in presenza di sintomatologia respiratoria (5/28), di segni sistemici (1/14) e di sintomi riproduttivi (1/7); i restanti 14 rinvenimenti sono avvenuti a partire dai 71 campioni prelevati per autocontrollo.

PCV3 è stato ritrovato in presenza di sintomi respiratori (12/28) e sistemici (3/14), ma non riproduttivi (0/7), mentre le altre 21 positività sono state attestate in assenza di segni clinici.

Su 43 casi in cui era segnalata la presenza di lesioni broncopolmonari, 9 si sono rivelati interessati da Mhyo e 18 da PCV3.

DISCUSSIONE

Le prestazioni delle due metodiche messe a punto si sono rivelate soddisfacenti in termini di sensibilità, specificità e ripetibilità. A ciò si aggiunge la convenienza intrinsecamente offerta dalle caratteristiche della *direct PCR*: non essendo richiesto l'impiego di kit di estrazione, la durata delle prove diagnostiche risulta infatti sostanzialmente dimezzata (con un beneficio tanto maggiore quanto più alto è il numero dei campioni); il risparmio economico, considerando anche il minor consumo di materiale monouso come puntali e provette, è invece grossolanamente stimabile sui 3,5-4 € per singolo campione.

Sebbene durante il processo di validazione non si siano ravvisati problemi, all'effettiva applicazione del protocollo relativo a Mhyo è stata riscontrata la sporadica presenza di bande aspecifiche (Figura 9a); essendo però queste ultime facilmente distinguibili dagli amplificati desiderati, si è scelto di non modificare ulteriormente i parametri, in quanto la ricerca di una maggior specificità avrebbe potuto impattare negativamente sulla sensibilità. Il protocollo di PCV3 si è invece confermato esente da questa problematica (Figura 9b).

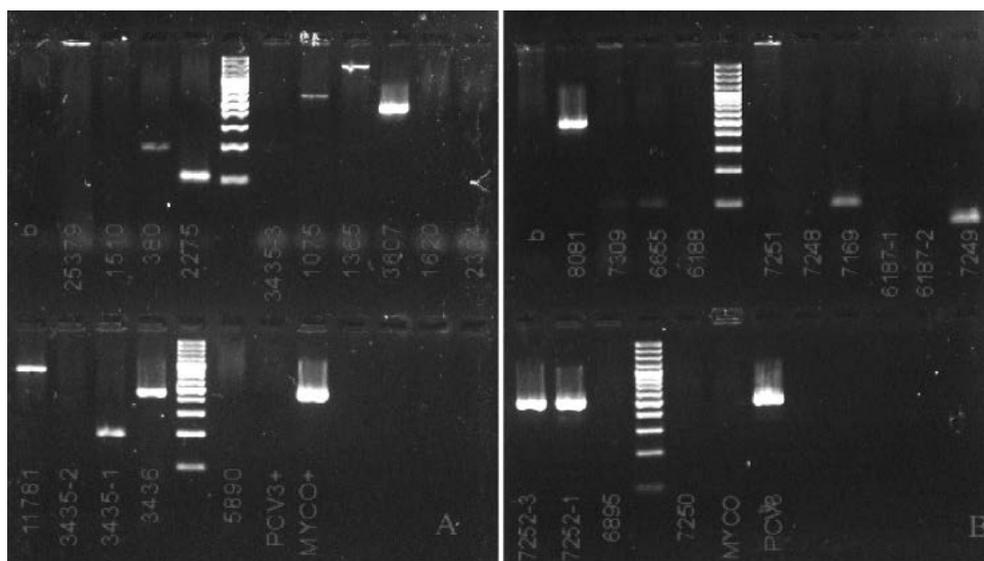


Figura 9 (a-b). Risultati della PCR diagnostica per Mhyo (a) e PCV3 (b)effettuata su alcuni campioni. Solo nel primo caso si ravvisa la presenza di alcune bande aspecifiche.
Figure 9 (a-b). PCR products obtained by amplification of Mhyo (a) and PCV3 (b). In the first case, some sporadic non-specific bands were present.

L'utilizzo delle metodiche validate per analizzare campioni provenienti dal territorio e l'analisi delle informazioni ad essi associate ha permesso di ottenere rilevanti informazioni sull'epidemiologia di questi patogeni.

La presenza di PCV3 sul territorio italiano, alla luce della marcata globalizzazione caratterizzante il settore suinicolo, non deve stupire. Le positività riscontrate non sono peraltro limitate ad un rinvenimento sporadico, ma evidenziano come PCV3 sia ampiamente diffuso nonostante la recentissima scoperta. Sebbene non sia possibile inferire sulla prevalenza per via della natura del campionamento, PCV3 è stato ritrovato nel 30% dei campioni: un dato sorprendente, il quale non fa che corroborare l'ipotesi che questo microrganismo sia epidemiologicamente affine a PCV2, patogeno ubiquitario e nella maggior parte dei casi non associato a sintomatologia clinica (Alarcon et al., 2013). Similmente, la distribuzione di Mhyo conferma come si tratti di un patogeno comunemente circolante. L'utilizzo di matrici non considerate ideali per la ricerca di questo batterio porta però a pensare che le positività attestate siano in realtà sottostimate.

La distribuzione di PCV3 nelle diverse fasce d'età e nei diversi siti produttivi non risulta trattata negli studi svolti finora su questo microrganismo. I dati raccolti nell'ambito di questo progetto mostrano un picco statisticamente significativo (con un 51% di positività) in corrispondenza del periodo tra la quinta e l'ottava settimana di vita: ciò è probabilmente collegato al rimescolamento e allo stress a cui sono sottoposti i suinetti al momento dello svezzamento, un momento particolarmente critico dal punto in termini di pressione infettante e di capacità di risposta dell'animale. La progressiva decrescita dell'incidenza fino all'8% riscontrato in fase di ingrasso rende plausibile ipotizzare che gli animali acquisiscano un'immunità in grado di contrastare efficacemente l'infezione; non è inoltre da escludere che l'organizzazione tipicamente multisito della filiera da cui provenivano i campioni contribuisca a combattere la trasmissione orizzontale. Il fatto che sia nelle scrofe sia nei lattonzoli si sia rinvenuto PCV3 porta a speculare sulla possibilità di una qualche forma di trasmissione verticale, sebbene il mancato rilevamento del virus in tessuti fetali non permetta di stabilire se questa trasmissione avvenga a livello intrauterino, o se invece

interessi il periparto. Le informazioni raccolte delineano un quadro epidemiologico che ancora una volta presenta punti di contatto con PCV2.

Per quanto riguarda Mhyo, la classica forma endemica della polmonite enzootica è sostenuta dalla trasmissione verticale diretta a livello di scrofaia e successivamente da un lento *spread* mediato dai suinetti infetti che coinvolge dapprima i compagni di nidiata e poi quelli di box (Thacker and Minion, 2012). I dati ottenuti confermano un pattern di questo tipo, con una decrescita progressiva delle positività dal 31% rilevato tra i lattonzoli (1°-4° settimana), al 24% tra i suinetti (5°-8° settimana), al 17,65% tra i magroni (9°-12° settimana), fino allo 0% attestato in fase di ingrasso. Per quanto riguarda le scrofe, è stato riportato un rapporto di proporzionalità inversa tra il numero di parti e la prevalenza di Mhyo, con le scrofette che presentano tassi di infezione più alti (Calsamiglia and Pijoan, 2000). Ciò è in accordo con i dati raccolti in questo studio, per quanto numericamente esigui (anche considerando che alcuni campioni sono stati prelevati da scrofe interessate da problematiche riproduttive, non associabili alla presenza di Mhyo).

Ai fini di una efficace applicazione di metodiche basate su PCR, il tipo di materiale biologico da cui viene estratto il materiale genetico risulta determinante per due principali ragioni: da una parte taluni patogeni sono caratterizzati da un tropismo per tessuti specifici e non risultano rilevabili in altri, dall'altra la natura della matrice può interferire in varia misura sulle prestazioni analitiche dei protocolli usati. Essendo il 90% dei campioni analizzati costituiti da sangue, polmone, *pool* di vari tessuti e fluido orale, si è deciso di comparare i risultati ottenuti a partire da queste matrici senza includere le rimanenti in quanto scarsamente rappresentate.

Le differenze tra le positività per Mhyo riscontrate nelle diverse matrici non si sono rivelate statisticamente significative. Il numero di positivi attestati a partire da tessuti polmonari era però in difetto rispetto alle frequenze attese: ciò può trovare spiegazione nel fatto che il polmone non rappresenta il sito d'elezione da campionare per la ricerca di Mhyo, non garantendo la stessa sensibilità che si avrebbe usando lavaggi broncoalveolari o tamponi tracheali (Fablet et al., 2010; Kurth et al., 2002). Poco idonei alla ricerca di questo microrganismo vanno considerati anche sangue, *pool* di organi e fluidi orali: come già scritto, è quindi ipotizzabile che le positività riscontrate siano fortemente sottostimate. Anche per ciò che concerne il riscontro di PCV3 non si sono evidenziate differenze statisticamente significative fra diverse matrici, per quanto sia possibile osservare un eccesso di positivi rispetto alle frequenze attese relativamente al tessuto polmonare. Mentre il rilevamento di PCV3 tramite PCR a partire da siero, polmone ed altri organi è già stato riportato (Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017) la possibilità di amplificarne il DNA a partire dai fluidi oronasali rappresenta un dato inedito.

Per quanto riguarda gli altri tipi di materiale biologico, un tampone nasale si è rivelato positivo per PCV3: anche in questo caso si tratta di una matrice mai testata prima per questo microrganismo. Tutte le spugnette, i tessuti placentari e i raschiati orofaringei sono invece risultati negativi per entrambi i microrganismi. È inoltre interessante notare come le PCR condotte a partire da campioni di materiale fetale o sangue materno collegati ad episodi di aborto non abbiano evidenziato in nessuno dei 7 casi la presenza di PCV3, a differenza di quanto riportato da altri autori (Palinski et al., 2017) respiratory and enteric disease, reproductive failure, and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS). Al contrario, uno dei feti è risultato positivo per Mhyo, per il quale non è riferita la possibilità di trasmissione intrauterina (Bürgi et al., 1990): considerato l'ingente *shedding* di Mhyo attraverso i secreti oronasali delle madri, ciò è probabilmente da attribuirsi ad una contaminazione ambientale ad aborto avvenuto.

La natura del campionamento si è rivelata un ostacolo nell'elaborazione dei dati relativi alle coinfezioni. Tutti i campioni erano infatti positivi almeno a uno tra PRRSV e PCV2, e l'intensità con cui i vari patogeni erano stati ricercati risultava estremamente variabile. Nella maggior parte dei casi ci si è quindi dovuti limitare a statistiche puramente descrittive. Attualmente non è disponibile alcun dato inerente alle interazioni tra PCV3 ed altri patogeni, quindi tutte le informazioni relative alle coinfezioni sono da considerarsi

inedite. La frequenza di rinvenimento di PCV3 nei campioni positivi per PRRSV si è rivelata maggiore rispetto alle attese, tanto da essere statisticamente significativa (Figura 10a). Questo dato è ulteriormente corroborato dal fatto che la frequenza delle positività per Mhyo (patogeno noto per le sue interazioni con PRRSV) non risulta influenzata dalla presenza o meno di PRRSV (Figura 10b), facendo pensare che il *bias* dovuto al campionamento sia in questo caso trascurabile. In ogni caso, l'accertamento del significato eziopatogenetico di questa associazione necessita di ulteriori studi sperimentali.

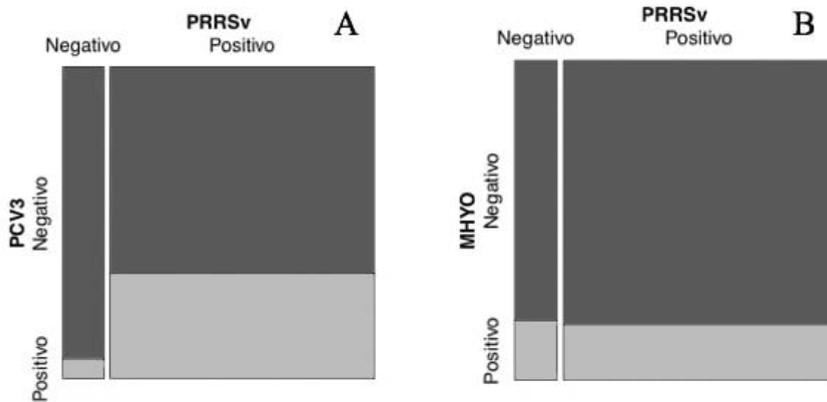


Figura 10 (a-b). *Mosaic plot* che mettono in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 e PRRSV (a) e di Mhyo e PRRSV (b).

Figure 10 (a-b). *Mosaic plots* that show how PRRSV test results relate to PCV3 (a) and Mhyo (b) ones.

Il ritrovamento di PCV3 è stato più frequente rispetto alle attese in campioni negativi per PCV2, ma ancora una volta si tratta di una differenza non statisticamente significativa (Figura 11). Per quanto suggestiva, l'eventualità che esista una competizione di qualche tipo tra PCV3 e PCV2 è ancora tutta da provare.

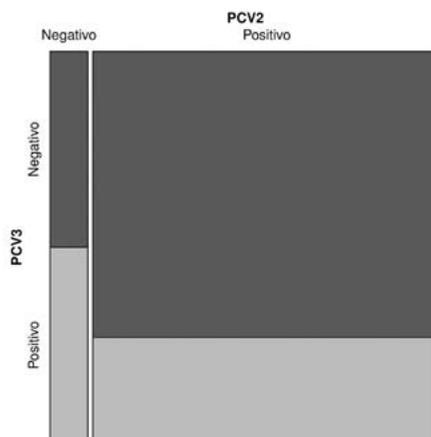


Figura 11. *Mosaic plot* che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 con quelli relativi a PCV2.

Figure 11. *Mosaic plot* that shows the relationship between PCV3 and PCV2 test results.

Tutti i microrganismi (con l'ovvia eccezione di PCV3) ritrovati in coinfezione con Mhyo risultavano ampiamente descritti come patogeni secondari la cui infezione è favorita dall'azione immunodepressiva di Mhyo (Thacker and Minion, 2012).

La frequenza con cui PCV3 è stato rinvenuto risulta maggiore rispetto alle attese in campioni prelevati in presenza di sintomatologia (Figura 12) e di reperti necroscopici patologici (Figura 13). Queste differenze non si sono tuttavia rivelate significative dal punto di vista statistico e, alla luce della natura del campionamento, non è possibile affermare che siano dovute a fondate ragioni eziopatogenetiche; più facile è supporre che le differenze osservate siano dovute almeno in parte all'effetto confondente della matrice campionata, dato che spesso alla presenza di sintomi e lesioni di natura respiratoria corrispondevano campioni prelevati a livello polmonare, in cui PCV3 è stato ritrovato più frequentemente rispetto ad altri tipi di matrice.

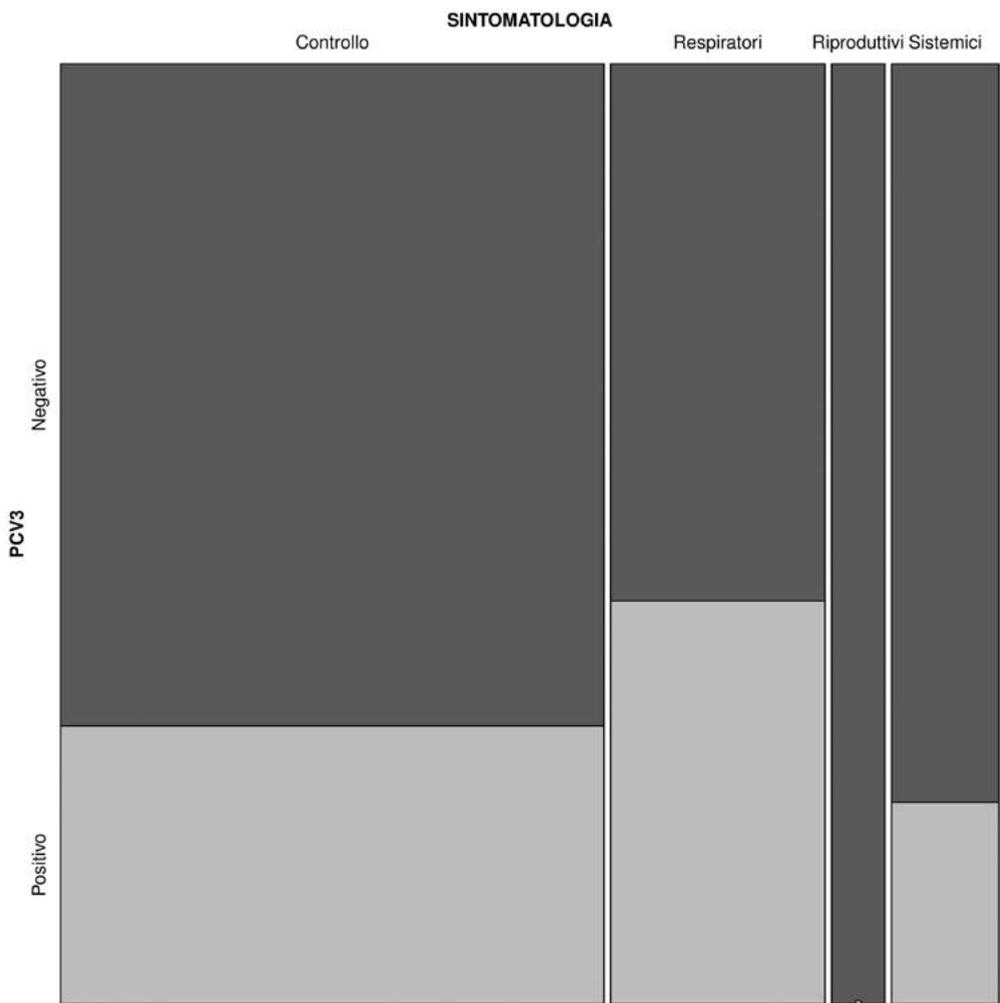


Figura 12. Mosaic plot che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 con l'anamnesi legata al prelievo.

Figure 12. Mosaic plot that shows the relationship between PCV3 test results and the presence of clinical signs.

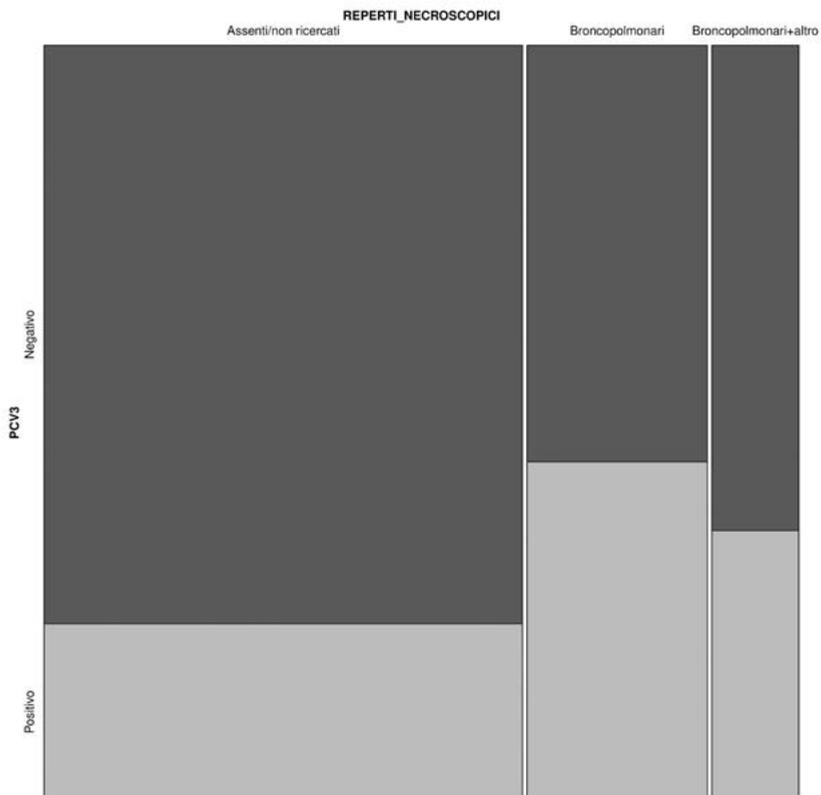


Figura 13. *Mosaic plot* che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 con la presenza di reperti necroscopici.

Figure 13. *Mosaic plot* that shows the relationship between PCV3 test results and the presence of anatomopathological findings.

Anche la frequenza con cui è stato rinvenuto Mhyo non presenta differenze statisticamente significative a prescindere dalla presenza o meno di sintomi o di reperti necroscopici, nonostante questo batterio reciti un ruolo chiave in numerosi meccanismi patogenetici a livello respiratorio. Ciò può forse spiegarsi considerando che l'85% dei campioni positivi per Mhyo (e l'87% dei campioni totali) risultavano positivi anche per PRRSV: in questo caso il ruolo di Mhyo non sarebbe quello classico di "door-opener", quanto piuttosto quello di fattore complicante l'infezione virale (Thacker et al., 1999). Sintomi e lesioni potrebbero quindi essere presenti a prescindere da Mhyo, il quale avrebbe il solo effetto di aggravarli. Pur in assenza di dati sui protocolli vaccinali adottati nei diversi allevamenti, non è da escludersi che anche la profilassi indiretta reciti un ruolo importante nel complicare l'interpretazione dei risultati: essa è infatti in grado di ridurre significativamente l'entità di sintomi e lesioni respiratori, ma non di evitare la colonizzazione (e quindi la positività alla PCR) né di diminuire la trasmissione (Haesebrouck et al., 2004).

Parallelamente allo svolgimento dei saggi di PCR, si è deciso di sequenziare il genoma completo di PCV3 a partire da uno dei campioni risultati positivi, precisamente il 32941. Ciò è stato fatto con una doppia finalità: da una parte confermare la specificità del metodo, dall'altra avere a disposizione la sequenza di un isolato di PCV3 effettivamente circolante sul suolo italiano.

La sequenza ottenuta, seppur chiaramente interna allo stesso *clade* raggruppante gli altri genomi conosciuti di PCV3 (Figura 14), risulta diversa da quelle cinesi e statunitensi attualmente note. Particolarmente importante è la distanza genetica dalla sequenza 29160, dalla quale è stato ricavato il controllo positivo utilizzato in questo lavoro, attestante l'assenza di false positività dovute a cross-contaminazioni.

L'evidente diversità genomica tra i diversi isolati, unitamente ad una circolazione attestata in diversi contesti geografici, rende altamente plausibile l'ipotesi che le radici della storia evolutiva di PCV3 siano di gran lunga antecedenti alla sua scoperta, contribuendo ad accumulare una volta di più questo virus emergente con PCV2.

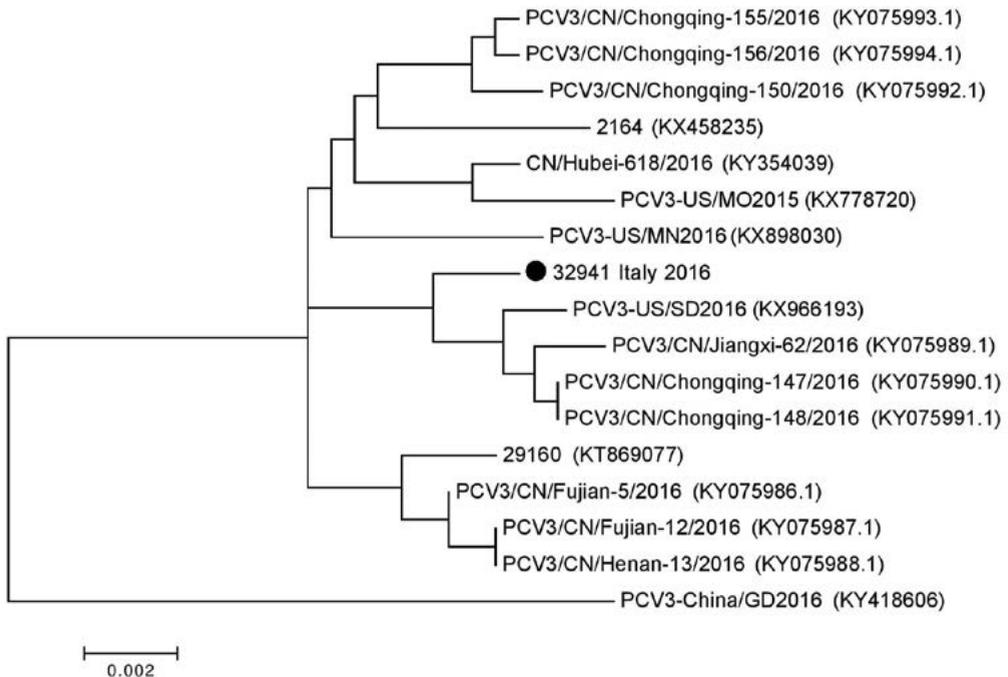


Figura 14. Albero filogenetico raggruppante tutte le sequenze di PCV3 conosciute. La sequenza evidenziata (cerchio nero) è stata ottenuta a partire dal campione 32941. L'albero è stato costruito con il software MEGA7 (Kumar et al., 2016) applicando il metodo di *Maximum Likelihood*, basato sul modello Tamura-Nei, a sequenze precedentemente allineate con il metodo *MUSCLE*.

Figure 14. Phylogenetic tree including all available PCV3 sequences. The highlighted sequence (full circle) has been obtained by sequencing sample 32941. The tree was built with MEGA7 software (Kumar et al., 2016), by applying the *Maximum Likelihood* approach based on Tamura-Nei model on sequences that were aligned with *MUSCLE*.

CONCLUSIONI

Il primo e principale obiettivo di questo studio era di natura marcatamente pratica: mettere a disposizione una metodica che potesse rappresentare un'alternativa concreta a quelle attualmente impiegate per la ricerca di Mhyo e di PCV3. In quest'ottica, l'adozione di

protocolli basati su *direct PCR* offre indiscutibili vantaggi: oltre ad essere facilmente attuabili nella pratica laboratoristica quotidiana, essi si sono rivelati estremamente convenienti sia dal punto di vista dei costi che dei tempi necessari alle analisi. La validazione dei protocolli ha infine permesso di attestarne le buone prestazioni in termini di specificità, sensibilità, ripetibilità e robustezza nei confronti dell'eterogeneità genetica dei microrganismi bersaglio: le loro performance si sono rivelate assolutamente comparabili con quelle garantite da saggi di PCR tradizionali.

Emerge quindi chiaramente la competitività delle metodiche prese in esame. Ciò vale per quanto riguarda Mhyo, la cui natura di batterio dalla crescita tipicamente *fastidious* rende la PCR un ausilio diagnostico di larghissimo impiego (Sibila et al., 2009) e ancor di più per quanto concerne PCV3: collocandosi in un contesto di ricerca ancora largamente inesplorato e in cui le alternative già validate sono poche, il protocollo ivi descritto potrebbe risultare estremamente utile per lo *screening* di grandi quantitativi di campioni. Una volta accertata l'accuratezza dei metodi diagnostici, essi sono stati applicati per la ricerca dei due microrganismi su campioni sperimentali provenienti da una delle maggiori realtà produttive del Norditalia. Mettendo in relazione gli esiti della ricerca di Mhyo e PCV3 con le informazioni disponibili in merito ai succitati campioni, è stato possibile estrapolare numerosi dati sull'epidemiologia dei due microrganismi.

Nel caso specifico di Mhyo, i trend osservati concordavano in massima parte con la vasta letteratura disponibile in merito. Il quadro ottenuto descrive un patogeno largamente diffuso, che tende ad infettare più frequentemente gli animali giovani ed è presente in coinfezione con numerosi patogeni secondari. L'uso di matrici poco idonee alla ricerca di questo batterio ha reso però poco rappresentative le frequenze rilevate, così come l'assenza di una chiara associazione attestata tra la presenza di Mhyo e la manifestazione di sintomi e lesioni respiratori è probabilmente da attribuirsi ad un *bias* di campionamento.

Diversa è la situazione in merito a PCV3: trattandosi di un virus scoperto solo recentemente, molti aspetti della sua epidemiologia risultano ancora oscuri. Questo studio ha permesso di muovere i primi passi in tal senso, a partire dal rinvenimento di PCV3 sul territorio italiano, che va ad aggiungersi al numero in rapida crescita di segnalazioni provenienti da diverse parti del mondo (Kwon et al., 2017; Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016; Stadejek et al., 2017) respiratory and enteric disease, reproductive failure, and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS. Le numerose positività riscontrate dimostrano peraltro la comune circolazione di PCV3, la quale rappresenta solo uno dei molti punti di contatto tra la sua epidemiologia e quella dell'ubiquitario PCV2.

Tra le altre informazioni ricavate si annoverano la presenza di un picco di frequenze di PCV3 in soggetti dall'età compresa tra le 5 e le 8 settimane, il rinvenimento a partire da matrici mai testate sinora e la presenza in coinfezione con vari patogeni sia virali che batterici; è stata inoltre attestata un'associazione statisticamente significativa tra le positività per PCV3 e quelle per PRRSV. Per una piena comprensione del significato di questi risultati, e quindi della reale importanza eziopatogenetica di PCV3, saranno ovviamente necessari ulteriori studi sperimentali, scevri dalle limitazioni che hanno connotato questo progetto, legate essenzialmente alla natura del campionamento, non sistematico ma di convenienza, la quale non ha permesso l'elaborazione di dati di prevalenza.

In un simile contesto, degno di nota è anche l'avvenuto sequenziamento, a partire da uno dei campioni rivelatisi positivi, di un genoma completo di PCV3, il quale risulta diverso da tutte le altre sequenze attualmente disponibili. Ciò fa propendere fortemente per l'ipotesi che la storia evolutiva di PCV3 abbia radici molto più antiche rispetto alla sua scoperta: si tratta dell'ennesima somiglianza con PCV2, la cui circolazione è stata dimostrata antecedere di decenni l'improvvisa affermazione di questo virus come patogeno su scala globale (Segalés et al., 2013).

I dati raccolti rappresentano quindi un promettente punto d'inizio per lo studio di questo microrganismo emergente, oltre ad essere un chiaro esempio dei risultati ottenibili applicando le metodiche validate in questo studio.

BIBLIOGRAFIA

- Alarcon, P., Rushton, J., Wieland, B. (2013) "Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – An economic disease model". *Prev. Vet. Med.* 110, 88–102.
- Bürgi, E., Seiz, O., Bertschinger, H.U. (1990) "Lack of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* from dam to fetus in experimentally infected pregnant gilts". 11th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Lausanne, Switzerland, July 1-5, 1990.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C. (2000) "Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows". *Vet. Rec.* 146, 530–2.
- Chae, C., 2016. "Porcine respiratory disease complex : Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2 , porcine reproductive and respiratory syndrome virus , and *Mycoplasma hyopneumoniae*". *Vet. J.* 212, 1–6.
- Drew, T.W. (2011) "The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity?". *Rev. Sci. Tech.* 30, 95–106.
- Fablet, C., Marois, C., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N. (2010) "Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach". *Vet. Microbiol.* 143, 238–245.
- Fan, S., Ku, X., Chen, F., Wang, Y., Yu, X., He, Q. (2017) "Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Circovirus Type 3 Strain, PCV3/CN/Hubei-618/2016, Isolated from China". *Genome Announc.* 5, e00100-17.
- Fournié, G., Kearsley-Fleet, L., Otte, J., Pfeiffer, D.U. (2015) "Spatiotemporal trends in the discovery of new swine infectious agents". *Vet. Res.* 46, 114.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A. (2004) "Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?" *Vet. Microbiol.* 100, 255–268.
- Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Qian, P., Wu, M., He, Q. (2017) "Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China". *Transbound. Emerg. Dis.* 64(3), 703-708.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets". *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Kurth, K., Hsu, T., Snook, E. (2002) "Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine". *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 463–469.
- Kwon, T., Yoo, S.J., Park, C.-K., Lyoo, Y.S. (2017) "Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations". *Vet. Microbiol.* 207, 178–180.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Lein, A., Vrijens, B., de Kruif, A. (1998) "The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system". *Zentralbl. Veterinarmed. B* 45, 495–505.
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., de Kruif, A. (1996) "Enzootic pneumonia in pigs". *Vet. Q.* 18, 104-9.
- Meng, X.-J., 2012. "Spread like a wildfire-The omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs". *Virus Res.* 164, 1–3.
- 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". *J. Virol.* 91, e01879-16.
- Phan, T.G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T., 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". *Virol. J.* 13, 184.
- Puvanendiran, S., Stone, S., Yu, W., Johnson, C.R., Abrahante, J., Jimenez, L.G., Griggs, T., Haley, C., Wagner, B., Murtaugh, M.P. (2011) "Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds". *Virus Res.* 157, 92–98.

- Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P., Varsani, A. (2017) "Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus". *Arch. Virol.* 1–17.
- Segalés, J., Kekarainen, T., Cortey, M. (2013) "The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease?" *Vet. Microbiol.* 165, 13–20.
- Shen, H., Liu, X., Zhang, P., Wang, L., Liu, Y., Zhang, L., Liang, P., Song, C. (2017) "Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China". *Transbound. Emerg. Dis.* 65(1), 264–266.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J. (2009) "Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection". *Vet. J.* 181, 221–231.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Maes, D., Dellagostin, O.A. (2013) "Mycoplasma hyopneumoniae: From disease to vaccine development". *Vet. Microbiol.* 165, 234–242.
- Stadejek, T., Woźniak, A., Milek, D., Biernacka, K. (2017) "First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland". *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 1350–1353.
- Team, R.C. (2016) "R Language Definition".
- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R., Thacker, B.J. (1999) "Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia". *J. Clin. Microbiol.* 37, 620–7.
- Thacker, E.L., Minion, F.C. (2012) "Mycoplasmosis", in: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., *Diseases of Swine*, 10th Edition. Wiley-Blackwell, Ames, pp. 779–797.
- Tombácz, K., Patterson, R., Grierson, S.S., Werling, D. (2014) "Lack of genetic diversity in newly sequenced porcine circovirus type 1 strains isolated 20 years apart". *Genome Announc.* 2(2), e00156-14.