



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

**Epidemiologia delle nuove specie di parvovirus del suino in
focolai di *reproductive failure* in Italia**

Relatore: Prof. Michele Drigo

*Correlatrice: Dott.ssa Claudia Maria
Tucciarone*

*Correlatore: Dott. Giovanni Loris
Alborali*

*Laureanda: Giulia Faustini
Matricola: 1128684*

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

RIASSUNTO

Tra i patogeni infettivi virali che colpiscono l'industria suinicola, il porcine parvovirus (PPV1) è ritenuto uno dei principali agenti responsabili del *reproductive failure*, le cui conseguenze sono riassunte nell'acronimo SMEDI (*stillbirth, mummification, embryonic death and infertility*). Inoltre, dal 2001 sono state identificate nuove specie di parvovirus suini, abbreviate in PPV2-7, anche se il loro ruolo non è stato ancora pienamente compreso.

In assenza di dati epidemiologici aggiornati sulla prevalenza del PPV1 e di informazioni riguardanti le nuove specie di PPV in Italia, si è deciso di indagarne la circolazione a partire da feti raccolti da focolai di *reproductive failure* in aziende situate nel Nord Italia, e conferiti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) nel biennio 2019- 2020.

La ricerca diagnostica delle diverse specie di PPV è stata effettuata avvalendosi di quattro distinte duplex real-time PCR, descritte in studi precedenti. Le frequenze di positività ai PPV sono state discusse anche in funzione delle positività agli altri patogeni, indagati all'interno del pacchetto diagnostico per *reproductive failure*, adottato presso l'IZSLER.

Tutte le nuove specie PPV2-7 sono state identificate in almeno un'azienda tra quelle testate nel 2019 e, in ordine, le più frequenti sono PPV6-1-3-7. Gli allevamenti risultati positivi per almeno una specie di PPV corrispondono al 46,7% e al 57,4% del totale delle aziende rispettivamente testate nel 2019 e nel 2020. Tra le co-infezioni rilevate, il contemporaneo riscontro di PCV-2 e almeno una specie di PPV è apparso il rilievo epidemiologico più frequente, essendo stata descritta nel 23,8% del totale delle aziende testate.

Il rilevamento delle nuove specie di parvovirus è indicativo della loro circolazione nel territorio italiano. Tuttavia, sebbene l'identificazione di nuove specie di parvovirus in campioni provenienti da focolai di *reproductive failure* suggerisca una loro potenziale rilevanza clinica, non è sufficiente per supportarne il nesso causale. Pertanto, si rendono necessari ulteriori studi dedicati e standardizzati, che prendano in considerazione varie matrici e categorie produttive, per verificare il reale impatto dei parvovirus e descriverne la circolazione. Inoltre, il parallelo sviluppo e la validazione di una metodica di sequenziamento, oltre a fornire una conferma diagnostica in termini di specificità, getteranno le basi per futuri studi filogenetici e di epidemiologia molecolare.

ABSTRACT

Among the viral infectious pathogens affecting the swine industry, porcine parvovirus (PPV1) has been considered one of the main agents responsible for *reproductive failure*, whose consequences are summarized in the acronym SMEDI (*stillbirth, mummification, embryonic death and infertility*). Since 2001 new species of porcine parvoviruses, namely PPV2-7, have been identified, although their role has not been fully understood yet.

In order to fill the lack of knowledge of the new porcine parvovirus epidemiology, this study provides an epidemiological update on the viral circulation in Italy, by evaluating their presence in fetuses collected from reproductive failure outbreaks in Northern Italian farms and delivered to the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). The detection of the different PPV species was performed using four different duplex real-time PCR assays, already described in previous studies. The PPV positivity was also discussed in relation to the frequencies of other pathogens detected by the diagnostic panel for *reproductive failure* in use at IZSLER.

PPV2-7 new species were detected in at least one farm among those tested in 2019 and the most frequently detected species are in order PPV6-1-3-7. Positive farms for at least one PPV species accounted for 46.7% and 57.4% of the total farms tested in 2019 and 2020, respectively. Among the detected co-infections, the contemporaneous presence of PCV-2 and at least one PPV species was the most frequent epidemiological finding, as they were identified in 23.8% of the total farms.

The detection of the new parvovirus species is indicative of their circulation in the Italian territory. However, although the identification of new parvovirus species in samples from *reproductive failure* outbreaks might be suggestive of a potential clinical role, it is not enough to support the causal nexus. Thus, further dedicated and standardized studies considering different matrices and production categories, are needed to verify the real impact of new parvovirus species and describe their circulation. Moreover, the development and validation of a sequencing method would provide diagnostic confirmation in terms of specificity and could be the launching pad for future phylogenetic and molecular epidemiological studies.

INDICE

RIASSUNTO.....	3
ABSTRACT.....	5
1 INTRODUZIONE	9
1.1 La produzione globale di carne	9
1.1.1 Un focus sull'Europa	11
1.2 Relazione tra allevamenti intensivi e malattie infettive	13
1.3 Malattie infettive implicate nel calo delle performance riproduttive.....	14
1.3.1 Aspetti clinici ed eziologici del <i>reproductive failure</i>	16
1.4 Parvovirus suino – PPV	17
1.4.1 Aspetti strutturali del PPV	18
1.4.2 Tassonomia ed elementi di variabilità genetica.....	20
1.4.3 Le nuove specie di PPV	28
1.4.4 Epidemiologia delle nuove specie di PPV	30
1.4.5 Meccanismi e tasso di evoluzione virale.....	32
1.4.6 Vie di trasmissione e patogenesi	36
1.4.7 Aspetti clinici e anatomopatologici.....	43
1.4.8 Procedure diagnostiche	48
1.4.9 Immunità, prevenzione e controllo del virus	50
2 SCOPO DELLA TESI.....	54
3 MATERIALI & METODI.....	55
3.1 Campioni	55
3.2 Database.....	55
3.3 Estrazione degli acidi nucleici.....	55
3.4 Disegno e produzione del plasmide	56
3.5 Metodiche duplex real-time PCR.....	56
3.6 Analisi statistica	58
4 RISULTATI e DISCUSSIONE.....	59
4.1 PPV: prevalenze e co-infezioni	59

4.2	PPV1-7 e altri patogeni: prevalenze e co-infezioni.....	62
5	CONCLUSIONE	71
6	BIBLIOGRAFIA	73
	RINGRAZIAMENTI	101

1 INTRODUZIONE

1.1 La produzione globale di carne

La produzione globale di carne ha raggiunto nel 2018 un valore di 342 milioni di tonnellate (riferito ad equivalenti peso carcassa), di cui circa il 37% è di provenienza avicola (127 milioni di tonnellate) e il 35% è di provenienza suinicola (120 milioni di tonnellate) (FAO, 2020). Nel complesso, se è vero che si sta osservando un continuo aumento nel consumo mondiale di carne e se ne prevede un ulteriore aumento del 12% entro il 2029 (rispetto ai 10 anni precedenti) a causa della crescita demografica e salariale, è altrettanto vero che questo non avviene in ugual misura in tutti i paesi e per tutti i tipi di carne e che nuovi fattori potrebbero stravolgerne le prospettive di crescita. In particolare, le differenze di prezzo tra carne rossa e carne bianca, in concomitanza all'aumento di un preoccupato interesse in materia di salute e sostenibilità ambientale, hanno determinato nei consumatori un graduale calo nel consumo di carne rossa, a favore di quella bianca, soprattutto di provenienza avicola. Nei prossimi 10 anni, infatti, il consumo di carne avicola e suina dovrebbero rappresentare rispettivamente il 50% e il 28% dell'incremento totale del consumo di carne globale, contro il 16% rappresentato dalla carne bovina.

Tuttavia, se per la carne avicola si prevede un aumento del consumo pro capite sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo (tra i quali ritroviamo le popolose India e Cina), lo stesso non si può dire per la carne suina. Per quest'ultima è infatti previsto un relativo calo dei consumi nei paesi industrializzati, da una parte a causa dell'aumento delle persone di culture per le quali si predilige il consumo di carne avicola, dall'altra perché meno economica e percepita come meno salutare. Questa differenza anticipa una situazione non omogenea relativamente anche ad altri fattori che influenzano il consumo di carne. Nei paesi industrializzati infatti, parallelamente ad un calo nei tassi di crescita salariale, si evidenzia un rallentamento del consumo di carne, motivo per cui in questi paesi si stanno raggiungendo livelli di saturazione in termine di consumo di carne pro capite. Al fattore economico, vanno aggiunti anche le credenze religiose, l'urbanizzazione ed una crescente sensibilità in materia di salute, qualità degli alimenti, ambiente, benessere animale e modi in cui la carne viene prodotta. Data la novità di quest'ultimi fattori, risulta difficile valutarne l'impatto sul mercato globale nei prossimi 10 anni: se adottati da una sempre più crescente fetta della popolazione, l'impatto potrebbe non essere irrilevante, anche se non è prevedibile quanto i consumatori siano disposti

a spendere per premiare filiere e aziende più rispettose in termini di salute, ambiente e benessere animale (OECD/FAO, 2020a).

Al contrario, nei paesi in via di sviluppo, la crescita demografica e salariale, l'urbanizzazione, il conseguente mutamento degli stili di vita e delle abitudini alimentari hanno determinato un significativo aumento del consumo di prodotti di origine animale, con previsioni di un raddoppio nella domanda entro il 2030 (Bruinsma, 2003; OECD/FAO, 2020a). A questi paesi si attribuisce infatti la maggior parte della crescita globale della produzione di carne dei prossimi 10 anni, contribuendo per l'80% all'incremento totale (OECD/FAO, 2020) (Figura 1).

2029 vs 2017-19

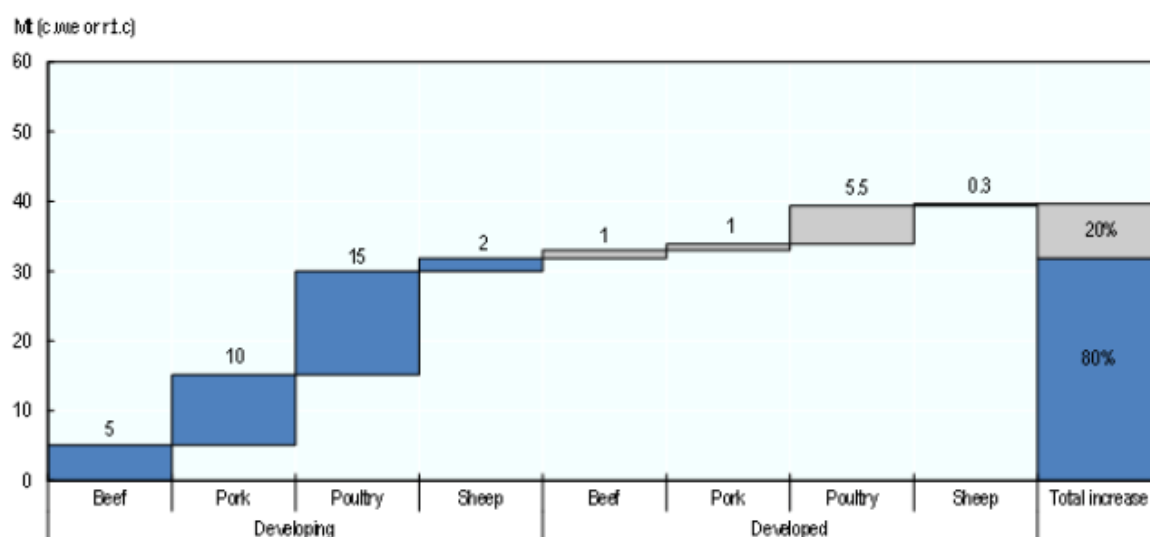


Figura 1: Crescita della produzione di carne per tipo di carne, nei paesi in via di sviluppo ("Developing") e nei paesi industrializzati ("Developed"). Note: c.w.e = Carcass weight equivalent, r.t.c. = ready to cook equivalent. Fonte: OECD/DAO, 2020, OECD Agriculture statistics (database).

Sebbene l'industria avicola e suinicola vengano considerate settori trainanti della produzione globale di carne per i prossimi 10 anni, è proprio la suinicoltura ad essere ritenuta una delle principali cause della riduzione della produzione carnea mondiale registratasi a partire dal 2019, da cui si prevede una graduale ripresa solo dopo il 2021 (OECD/FAO, 2020). Il motivo di questo calo è da individuare nella diffusione della Peste Suina Africana in Cina: nel 2019 il settore suinicolo è stato l'unico settore ad aver registrato una contrazione nella produzione mondiale di carne e il 2020 ha poi riconfermato questo calo repentino, con la produzione mondiale di carne suina che è scesa a 101 milioni di tonnellate, l'8% in meno rispetto all'anno precedente e poco più del 16% in meno rispetto al 2018 (FAO, 2020). Il complessivo calo produttivo del 10% registratosi in Cina nel 2019, è stato però compensato dall'aumento della

produzione di carne in Argentina, Unione Europea, Turchia e Stati Uniti, limitando così a poco meno del 2% il calo della produzione globale (OECD/FAO, 2020).

1.1.1 Un focus sull'Europa

Mentre a livello globale la suinicoltura occupa il secondo posto in termini di produzione, subito dietro all'avicoltura, in Europa l'industria suinicola registra nel 2018 la più alta produzione, con circa 29 milioni di tonnellate di carne, a cui segue l'industria avicola con 19 milioni di tonnellate (FAOSTAT, 2020) (Figura 2).

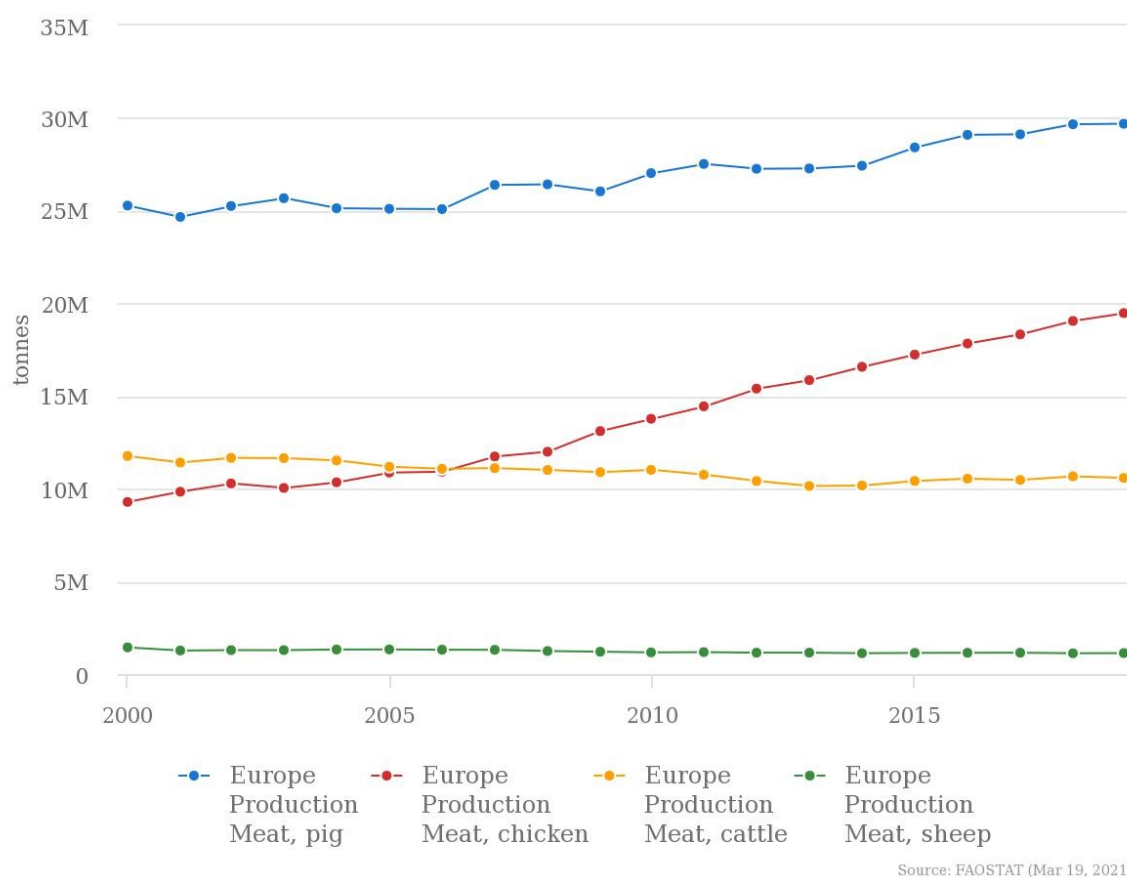
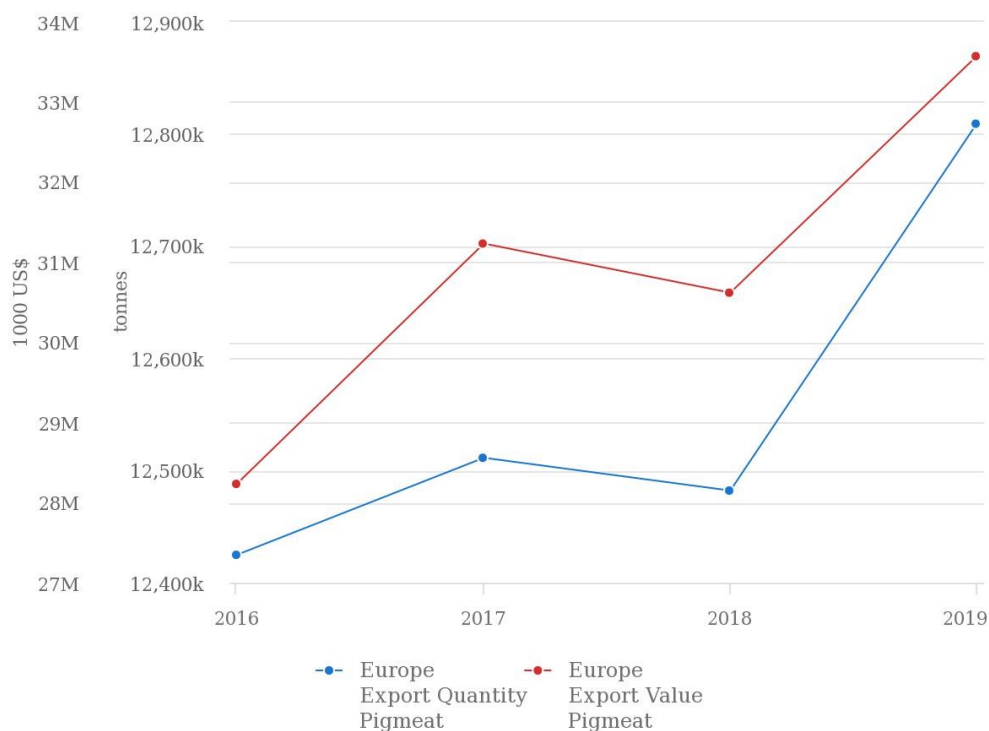


Figura 2: Andamento in Europa della produzione di carne di maiale, pollo, bovino, ovino dal 2000 al 2020 (FAOSTAT, 2020).

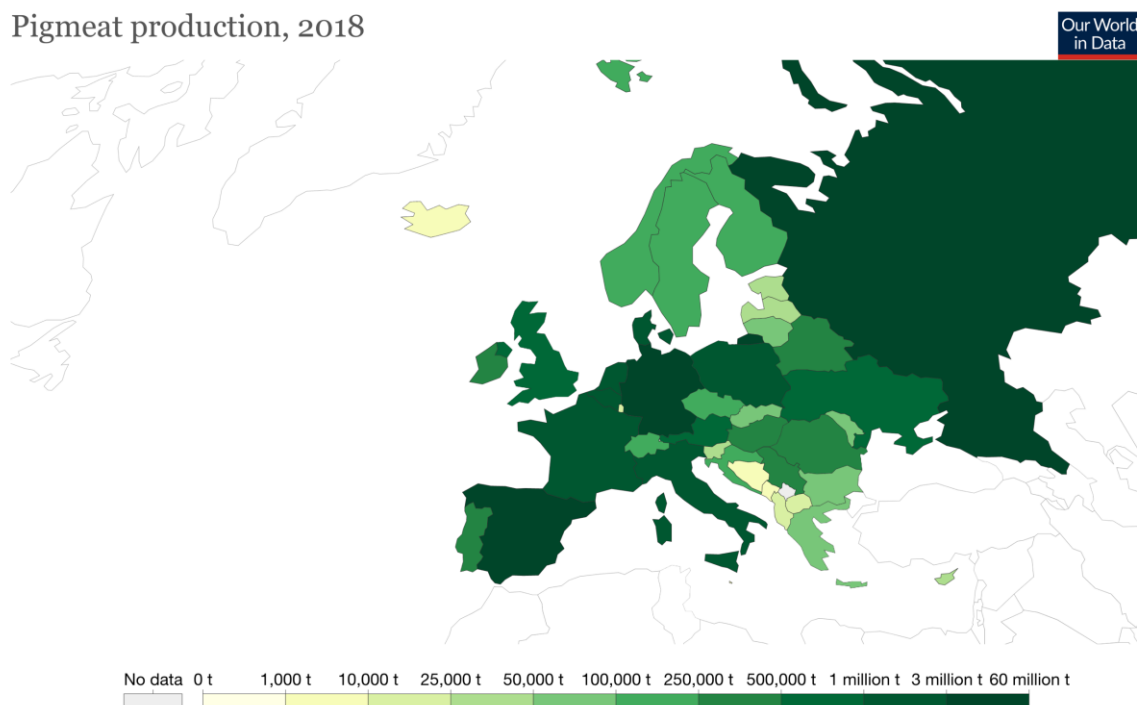
Nel quadriennio 2016-2019, l'Europa ha esportato più di 12 milioni di tonnellate di carne suina, per un valore di circa 30 miliardi di USD (FAOSTAT, 2020) (Figura 3). I maggiori produttori di carne suina in Europa sono Germania e Spagna, a cui seguono Francia, Polonia, Italia, Paesi Bassi e Belgio (FAOSTAT, 2020) (Figura 4).



Source: FAOSTAT (Mar 24, 2021)

Figura 3: Andamento delle esportazioni Europee di carne suina e relativo valore in USD (FAOSTAT, 2020).

Pigmeat production, 2018



Source: UN Food and Agricultural Organization (FAO)

Note: This refers to total meat production, from both commercial and farm slaughter. Data are given in terms of dressed carcass weight, excluding offal and slaughter fats.

OurWorldInData.org/meat-production • CC BY

Figura 4: produzione di carne suina totale nel 2018, riferita sia agli allevamenti industriali che a quelli a gestione familiare. I dati si riferiscono al peso della carcassa, escluse le frattaglie e i grassi di macellazione (Meat and Dairy Production - Our World in Data, 2020).

1.2 Relazione tra allevamenti intensivi e malattie infettive

Lo scenario appena descritto certifica la leadership della suinicoltura nella produzione carnea europea e conferma ulteriormente il suo ruolo centrale nel commercio globale. A tal proposito si rende necessario comprendere quali sono i principali pericoli che minacciano l'allevamento suino, a partire dalle malattie infettive. Infatti, le perdite economiche legate a mortalità, cali produttivi, restrizioni commerciali, perdita del valore di mercato e possibile sfiducia del consumatore nei confronti della salubrità degli alimenti (VanderWaal & Deen, 2018), dovute all'insorgenza di malattie infettive nel comparto dell'allevamento animale, rendono quest'ultime una delle principali minacce alla produzione e al commercio globale di carne suina (Morgan & Prakash, 2006).

Nell'ultimo trentennio, la crescente domanda di carne suina ha portato infatti ad una rapida intensificazione della produzione, il cui intrinseco aumento della densità animale e del commercio globale, favoriscono la trasmissione di agenti patogeni (Drew, 2011) e una loro prioritizzazione, sia in termini temporali che spaziali (VanderWaal & Deen, 2018). Non bisogna però dimenticare che, all'aumento degli allevamenti intensivi, si sono affiancati anche netti miglioramenti nel campo della diagnostica, della sorveglianza sanitaria e della ricerca scientifica. Questi elementi non solo hanno contribuito ad una più efficace ed efficiente rilevazione dei patogeni coinvolti nelle problematiche allevatoriali, ma hanno anche permesso di individuare delle priorità nel contrasto e nel controllo degli agenti responsabili di malattia.

Ipotizzando che i fondi destinati alla ricerca scientifica in un paese siano indirizzati verso lo studio dei patogeni prevalenti e con un maggiore impatto economico e sanitario, si può desumere che le pubblicazioni scientifiche in un determinato periodo, permettano di avere un'idea sulla priorità data ad un certo patogeno e alle sue conseguenze. Utilizzando quindi le pubblicazioni scientifiche come indicatori, si osservano delle differenze tra paesi in via di sviluppo e industrializzati nella tipologia di patogeni maggiormente studiati: mentre nei primi le pubblicazioni si concentrano maggiormente su elminti e protozoi, nei paesi in cui l'allevamento intensivo è ormai consolidato, le pubblicazioni sono incentrate sugli agenti maggiormente responsabili dei cali nella produzione (VanderWaal & Deen, 2018). Questo suggerisce come l'intensificazione dell'allevamento, con il conseguente aumento nella

sorveglianza, nella profilassi e nella biosicurezza, sia stata particolarmente efficace nel controllo di elminti, protozoi e alcuni batteri.

Allo stesso tempo però, queste considerazioni ci permettono di mettere in luce almeno un parziale fallimento dei metodi attuali di gestione nel controllo dei patogeni responsabili di alcune delle cosiddette “*production diseases*”, per cui l’intensificazione dell’allevamento può essere stata controproducente, se non addirittura predisponente. Data l’improbabile inversione di tendenza globale dalla produzione intensiva, si ipotizza che queste malattie saranno sempre più oggetto di ricerca negli anni a venire (VanderWaal & Deen, 2018).

1.3 Malattie infettive implicate nel calo delle performance riproduttive

Nell’allevamento suino, la numerosità della nidiata e l’accrescimento risultano essere due parametri il cui monitoraggio è di fondamentale importanza per garantire elevati standard produttivi. Da questo punto di vista, le malattie infettive che provocano aborto, aumento della mortalità dei suinetti e calo dell’incremento ponderale, rappresentano una minaccia alla suinicoltura, soprattutto quella intensiva, in cui l’alta densità di animali dalla scarsa varietà genetica favorisce la trasmissione, la diffusione e, in alcuni casi, l’evoluzione di agenti infettivi (Drew, 2011).

Una delle principali necessità dell’allevamento suinicolo è sicuramente la comprensione, e di pari passo la gestione, delle problematiche che colpiscono il comparto riproduttivo, in cui la salute della scrofa e dei suinetti sono strettamente connesse. La prevenzione delle malattie infettive che influiscono sulle performance riproduttive è un aspetto cruciale nel rendere un’azienda suinicola competitiva sul mercato, considerando in particolare le importanti conseguenze economiche che queste hanno sul comparto suinicolo mondiale (Renken et al., 2021). Diverse sono infatti le analisi economiche che confermano l’impatto finanziario che malattie come la Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) hanno sulla produzione: negli Stati Uniti, i focolai di PRRS avvenuti nel 2005 hanno causato perdite pari a circa 560 milioni di dollari (Neumann et al., 2005), valori confermati da un più recente studio del 2013, che ha stimato perdite pari a 664 milioni di dollari dovuti alla sola PRRS (Holtkamp, 2013). Le malattie sistemiche riproduttive, così come le infezioni del tratto urogenitale, possono infatti avere un impatto negativo sulla produttività di un allevamento, attraverso le conseguenze che queste determinano su parametri importanti nella gestione aziendale, quali ad esempio

l'indice di concepimento, i suinetti nati vivi/nidiata, la mortalità pre-svezzamento (Leman et al., 1992).

Numerosi sono gli agenti infettivi abortigeni riportati in letteratura, sia di natura batterica che di natura virale. Nel tratto genitale, vengono solitamente isolati patogeni opportunisti come stafilococchi, streptococchi, coliformi e corinebatteri (Alborali et al., 2006; Leman et al., 1992). Nella determinazione delle infezioni uterine, ai patogeni facoltativi si possono aggiungere specifici organismi associati più comunemente a malattie sistemiche riproduttive (Leman et al., 1992), come *Leptospira spp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e soprattutto agenti virali, centrali nella patologia riproduttiva suina (Alborali et al., 2006). Tra gli agenti infettivi che interessano il comparto riproduttivo, le maggiori perdite economiche sono causate dalle malattie delle scrofe gravide conseguenti ad infezioni virali (Althouse et al., 2019; Kwit et al., 2016): i virus risultano essere infatti tra quelli che più condizionano negativamente le performance riproduttive, soprattutto per le conseguenze che determinano sulle scrofe gravide in termini di risentimento sistemico e aborto (Mengeling et al., 2000), sempre con una certa variabilità a seconda dei fattori relativi alla gestione, all'agente e all'ospite (Althouse et al., 2019; Leman et al., 1992). Considerando questi 3 fattori che richiamano alla triade epidemiologica *agente – ospite – ambiente*, tutti gli ospiti potenziali che ritroviamo nel comparto riproduttivo, dal verro, alla scrofa, fino al suinetto, sono coinvolti nella trasmissibilità. Giusto per citare qualche esempio, tra i diversi agenti virali che possono dare problemi riproduttivi nel verro, e/o apparentemente avere un ruolo epidemiologico nella trasmissione di malattie tramite il seme (Althouse & Rossow, 2011; Guérin & Pozzi, 2005), ricordiamo porcine circovirus 2 (PCV-2) (Madson et al., 2009; Sarli et al., 2012), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (Nathues et al., 2016; Prieto et al., 1997), per cui è riportato anche un calo della libido (Done et al., 1996), e i porcine parvovirus (PPV) (Lucas et al., 1974; Maes et al., 2008). Dal punto di vista della fisiologia dell'infertilità, non è poi da dimenticare come, qualsiasi patogeno in grado di determinare uno stato febbrile, con un conseguente innalzamento indesiderato della temperatura corporea e quindi testicolare, possa portare ad un'alterazione del processo di spermatogenesi (Althouse et al., 2019).

Focalizzandoci ora sul fattore *agente*, tra i virus di maggiore interesse nel comparto riproduttivo, non pochi sono quelli che in letteratura vengono riportati come responsabili del calo delle performance riproduttive, considerando anche il fatto che qualsiasi virus in grado di causare malessere nelle scrofe, o di attraversare la barriera placentare ed infettare il prodotto

del concepimento, può essere categorizzato come un potenziale patogeno riproduttivo (Mengeling et al., 2000). Diversi autori concordano però sul fatto che, tra i principali patogeni che colpiscono il tratto riproduttivo, possiamo annoverare PRRSV, i PPV, l'Aujeszky disease virus (ADV) (Alborali et al., 2006; Bureau et al., 2005; Kwit et al., 2016; Leman et al., 1992; Maldonado et al., 2005; Zhao et al., 2016) e l'encephalomyocarditis virus (EMCV) (Bureau et al., 2005; Kwit et al., 2016; Leman et al., 1992; Maldonado et al., 2005). A questo gruppo va però aggiunto PCV-2, considerato l'agente causale della Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) e che, ormai da più di 20 anni, viene anch'esso associato al *reproductive failure* della scrofa, con effetti diretti sul feto (Maldonado et al., 2005; O'Connor et al., 2001; West et al., 1999).

1.3.1 Aspetti clinici ed eziologici del *reproductive failure*

Come già anticipato, i problemi riproduttivi nella suinicoltura sono il risultato di diversi fattori, infettivi e non, ed è compito del medico veterinario discernere un calo nella produttività di un gruppo di scrofe dovuto ad agenti patogeni, da un calo legato ad esempio alla gestione ambientale o nutrizionale, date le interrelazioni tra questi fattori e l'attività riproduttiva e che potrebbero essere all'origine del problema. Considerando questa correlazione con i fattori gestionali e i quadri clinici ed epidemiologici, che spesso si sovrappongono nella realtà quotidiana di approccio ad un problema riproduttivo, dare un'unica definizione di *reproductive failure*-virus dipendente, risulta al quanto complicato, se non impossibile.

Tralasciando i fattori manageriali e concentrandoci sulla relazione tra agente e ospite, la presentazione clinica dipende da molti elementi, quali ad esempio il virus, il momento della gestazione in cui l'infezione avviene, la concomitante presenza di altre infezioni e lo stato immunitario della scrofa o della scrofetta (Kwit et al., 2016; Mengeling & Cutlip, 1976). Ne risulta che, mentre alcuni virus possono causare una grave malattia acuta nella scrofa, con conseguente aborto e perdita dell'intera nidiata, altri virus determinano pochi segni clinici nell'immediato, se non addirittura nessuno, con le conseguenze dell'infezione che si manifestano soltanto al termine della gestazione, in cui tutti, o soltanto una parte dei suinetti (Mengeling et al., 1980) nascono morti, deboli o malformati (Mengeling et al., 2000). Nell'ampia variabilità di manifestazioni cliniche, ci sono infatti fenomeni che possono passare inosservati, come la morte embrionale precoce e il riassorbimento dei feti (Mengeling et al.,

1980), e/o essere diagnosticati solo al parto, come in caso di mummificazione di uno o più feti, o in caso di suinetti nati morti.

Date queste considerazioni, nella definizione di *reproductive failure* potremmo quindi comprendere tutti i casi, singoli o compresenti, di infertilità, riassorbimento embrionale, parto prematuro, suinetti “nati morti”, mummificati o deboli (Althouse et al., 2019; Paton & Done, 2002).

Risulta quindi evidente come, davanti ad un caso di aborto e di calo delle performance riproduttive di un allevamento suinicolo, il veterinario debba cercare di ripercorrere a ritroso l'evento o gli eventi che hanno condotto alla condizione che è chiamato a risolvere.

In questo quadro complesso, fatto di aspetti gestionali e coinfezioni virali, il parvovirus suino è considerato uno dei principali agenti responsabili dei disordini riproduttivi che possono interessare il comparto suinicolo, i cui effetti sono riassunti nell'acronimo SMEDI (*stillbirth, mummification, embryonic death and infertility*) (Streck & Truyen, 2020). Al fine di comprendere l'impatto che un patogeno virale come il parvovirus suino gioca (anche) nella suinicoltura italiana, tenendo conto anche del suo ruolo nelle co-infezioni con agenti importanti nel comparto riproduttivo come PRRSV e PCV-2, un approfondimento degli aspetti strutturali, epidemiologici, patogenetici ed evolutivi del parvovirus suino appare quindi necessario.

1.4 Parvovirus suino – PPV

A partire dalla metà degli anni 60, in un quadro storico caratterizzato da ingenti perdite riproduttive, al tempo principalmente associate a problemi di natura ambientale, nutrizionale, genetica e tossicologica (Rasbech, 1969), cominciarono a comparire le prime evidenze dell'importanza del parvovirus suino (PPV) nella patologia riproduttiva della scrofa.

Isolato per la prima volta nel 1964 in Germania come contaminante di una coltura cellulare primaria utilizzata per la propagazione del classical swine fever virus (Mayr & Mahnel, 1964), nel 1967 il parvovirus suino venne poi associato a diversi disordini riproduttivi nelle scrofe (Cartwright & Huck, 1967). Ci vollero però diversi anni affinché si venisse a conoscenza dell'entità della sua distribuzione, ormai endemica a livello globale, mettendo così in luce il suo ruolo nella patologia riproduttiva suina (Joo et al., 1976; Mengeling & Cutlip, 1976). Segni clinici quali aborto, estro ricorrente e nascita di feti mummificati e nati morti, comunemente

osservati in caso di infezione da PPV, han fatto sì che questo virus venisse associato al quadro clinico descritto dall'acronimo SMEDI (Mengeling et al., 2000; Truyen & Streck, 2019).

In tassonomia, secondo quanto riportato dall'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), il PPV è inserito nella famiglia *Parvoviridae*, sottofamiglia *Parvovirinae* e, se fino ad appena due decenni fa, lo “storico” PPV (da qui in avanti riportato come PPV1) era il solo a farne parte, a partire dal 2001 nuove specie di porcine parvovirus, lo hanno affiancato, ampliando così l'albero filogenetico di questa famiglia virale.

Mentre da una parte non sarebbe azzardato considerare il PPV1 tra le cause più importanti di *reproductive failure* nella suinicoltura globale (Truyen & Streck, 2019), dall'altra, il ruolo dei più recenti PPV (2-7) non è ancora stato chiarito. La comparsa e la diffusione di virus, i cui cambiamenti di pochi amminoacidi delle proteine capsidiche possono potenzialmente causare significative differenze in termini di antigenicità e virulenza, devono essere guardati con preoccupato interesse, in quanto rappresentano una minaccia alla profilassi garantita dai vaccini sinora disponibili.

1.4.1 Aspetti strutturali del PPV

I parvovirus sono dei virus di piccole dimensioni, privi di *envelope*, con capsidi icosaedrico del diametro di circa 25 nm. Il genoma è costituito da DNA a singolo filamento, le cui dimensioni vanno da 4 a 6,3 kb, contenente solitamente 2 cassette geniche (Palinski et al., 2016; Zádori et al., 2005) e solo due promotori (Streck et al., 2015). Come in tutti i parvovirus, alle estremità sono presenti delle sequenze terminali palindrome di circa 120-200 basi, che formano delle strutture complesse a forcina (*stem-loop* o *hairpin*), fondamentali per la replicazione. L'*open reading frame* (ORF) dell'estremità 5' codifica per le proteine non strutturali (NS), le quali hanno una attività di replicasi (REP); l'ORF dell'estremità 3' codifica invece per le proteine strutturali (VP) o proteine capsidiche (CP).

Il genoma del PPV codifica per 7 proteine, anche se le principali sono 4, due strutturali e due non strutturali, e amplia la propria capacità codificante utilizzando un meccanismo di *alternative splicing* (Palinski et al., 2016; Streck et al., 2015). Le proteine non strutturali, NS1 e NS2, sono coinvolte nella replicazione del DNA virale, e insieme a queste anche una terza proteina NS3 è stata descritta (Bergeron et al., 1993). Le proteine strutturali, VP1 e VP2, costituiscono il virione. La più piccola delle due, VP2, è ottenuta attraverso lo *splicing* dello stampo di mRNA di VP1, motivo per cui l'intera sequenza di VP2 è presente in quella di VP1.

Quest'ultima proteina, costituita da 729 residui amminoacidici, si differenzia infatti per una porzione amino-terminale di 120, assente in VP2. Dallo stesso mRNA di VP2, si ottengono anche altre due proteine, una strutturale e una non strutturale: la prima, VP3, che è frutto di una modificazione post-traduzionale di VP2 (Simpson et al., 2002; Streck & Truyen, 2020) e la proteina non strutturale tardiva SAT, la cui traduzione inizia dopo 7 nucleotidi dal punto di inizio della VP2 (Zádori et al., 2005).

Similmente alle specie Carnivore protoparvovirus 1, il capside dei PPV è costituito da circa 60 copie identiche di proteine virali, disposte a simmetria icosaedrica, di cui circa il 90% sono VP2 e il 10% VP1 (Chapman & Rossmann, 1993; Simpson et al., 2002; Streck & Truyen, 2020). Ognuna di queste copie di proteine, chiamate subunità, ha una struttura costituita da 8 β -foglietti antiparalleli, insieme ad un' α -elica e 4 regioni a *loop*. L'architettura icosaedrica presenta solitamente una simmetria rotazionale, per cui vengono descritti diversi assi di simmetria (*axis*) nominati a seconda di quante subunità compongono l'asse (es. *2,3,5 fold-axis*). A seconda della famiglia virale, diverse strutture possono poi modellare la superficie capsidica: nei parvovirus, i vertici composti da 5 subunità (*5-fold axis*) sono circondati da avvallamenti (*canyon*), mentre le 2 subunità che vanno a costituire i bordi che congiungono i vertici (*2-fold axis*) formano delle leggere depressioni (*dimple*); si erigono invece delle sporgenze (*spike o peak*) sulle 3 subunità (*3-fold axis*) che circondano il centro di ciascuna delle 20 facce triangolari che compongono l'icosaedro (Hueffer & Parrish, 2003; Simpson et al., 2002). Il risultato è una struttura capsidica complessivamente sferica (Figura 5). Gli amminoacidi che costituiscono le regioni a *loop* sono tra i residui che più spesso variano tra i ceppi e isolati virali. Questi sono situati principalmente a livello dei 2 e 3-*fold axis*, regioni considerate importanti per l'infezione e l'immunogenicità del virus (Simpson et al., 2002; Streck et al., 2015).

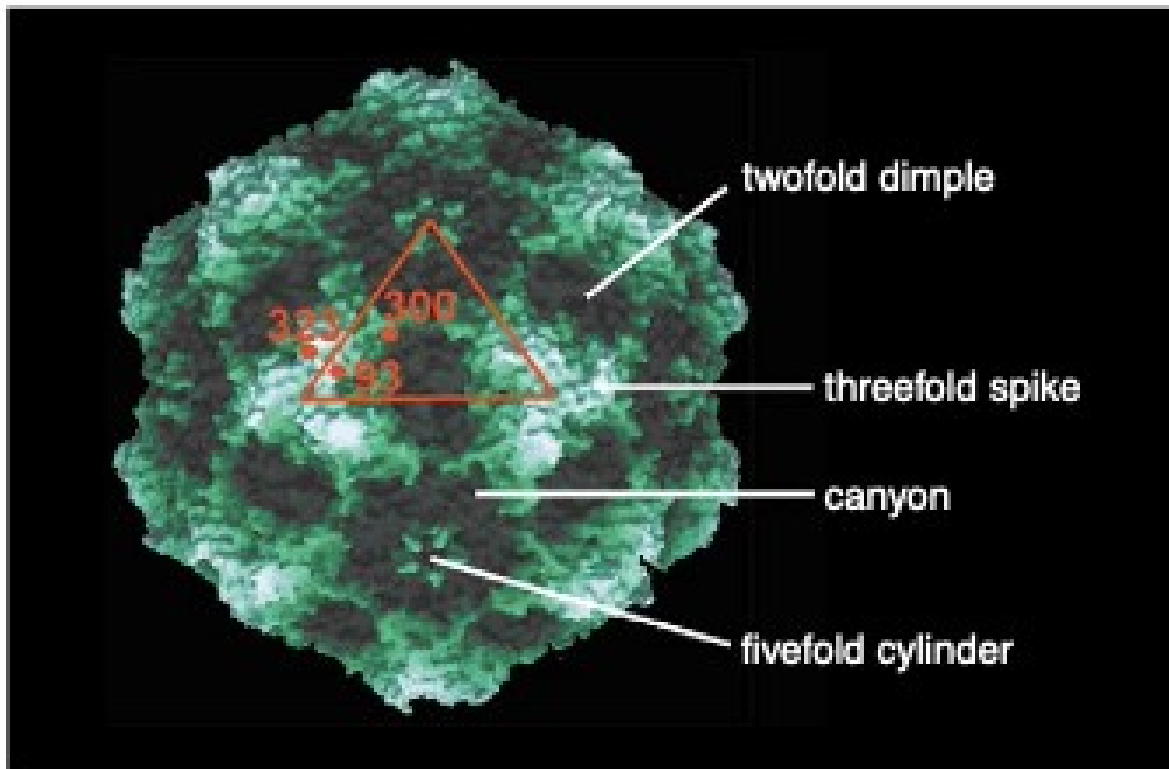


Figura 5: Modello in rendering della superficie capsidica di canine parvovirus (CPV). Nell'immagine vengono indicate le depressioni e gli spike rispettivamente in corrispondenza del 2 e 3-fold axis. I canyon si formano invece attorno ai 5-fold axis. Il triangolo rosso indica un'unità capsidica asimmetrica, mentre i pallini rossi indicano aree in corrispondenza del 3-fold spike, in cui eventuali sostituzioni dei residui amminoacidici di VP2 (93, 300 e 323) influenzano lo spettro d'ospite di CPV e feline parvovirus (FPV). Nella determinazione dell'antigenicità e del tropismo di molti parvovirus, le strutture in corrispondenza dei 3-fold delle subunità proteiche giocano un ruolo importante (Chang et al., 1992; Hueffer & Parrish, 2003).

Una delle particolarità di PPV risiede nella natura degli amminoacidi che compongono la superficie interna del capsid. La maggior parte dei virus infatti possiedono amminoacidi basici sulla superficie interna del capsid virale, e si suppone che questi vadano ad interagire con i gruppi fosfato presenti nel DNA (Xie & Chapman, 1996). Il PPV, invece, possiede numerosi amminoacidi neutri che potrebbero provocare una notevole reazione entalpica elettrostatica con le molecole del DNA, determinando un più efficiente impacchettamento del genoma rendendo così il virione più stabile (Steitz, 1990).

1.4.2 Tassonomia ed elementi di variabilità genetica

La famiglia *Parvoviridae* era originariamente divisa in due sottofamiglie: la sottofamiglia *Parvovirinae*, i cui membri infettano i vertebrati e nella quale sono inclusi 8 generi (*Bocaparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus*, *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus* e *Copiparvovirus*), e la sottofamiglia *Densovirinae*, virus che

interessano gli invertebrati (insetti, artropodi ed echinodermi) (Cotmore et al., 2019). Recentemente è stata aggiunta la sottofamiglia *Hamaparvovirinae* (Pénzes et al., 2020).

Secondo l'ultima classificazione tassonomica rilasciata dall'ICTV, il parvovirus suino 1 fa parte della famiglia *Parvoviridae*, sottofamiglia *Parvovirinae*, specie *Ungulate protoparvovirus 1*. Fino a circa 20 anni fa, il PPV1 era considerato un virus molto stabile sia dal punto di vista genetico che antigenico (Duffy et al., 2008; López-Bueno et al., 2006; Lukashov & Goudsmit, 2001). Studi recenti hanno però messo in evidenza una notevole variabilità genetica dettata dai molti ceppi virali che sono stati isolati negli ultimi anni, i quali si differenziano marcatamente in termini di patogenicità: alcuni ceppi, anche se inoculati direttamente nel feto, non sono assolutamente patogeni; altri possono invece essere responsabili di malattia anche nei feti immunocompetenti, ovvero dopo il 70° giorno di gestazione (Tabella 1).

Il ceppo non patogeno NADL-2, isolato nel 1976 negli USA (Zimmermann et al., 2006), è il primo ad essere stato sequenziato (Bergeron et al., 1993): esso causa una viremia limitata, nelle infezioni sperimentali non attraversa la barriera placentare e viene inoltre utilizzato in forma attenuata per gli attuali vaccini (Streck & Truyen, 2020). Sebbene NADL-2 risulti completamente innocuo quando somministrato oralmente, se inoculato direttamente nell'utero nei fluidi extra-fetali, esso causa aborto (Cutlip & Mengeling, 1975; Truyen & Streck, 2019). Altri ceppi virulenti isolati nei feti mummificati, quali NADL-8 e IAF-76, al contrario, causano viremia e attraversano la placenta, infettando così i feti non immunocompetenti (Mengeling & Cutlip, 1975). Il ceppo NADL-8 è inoltre risultato infettivo e letale a diluizioni nettamente maggiori rispetto a quelle riscontrate nel caso di NADL-2 (superiore di 10'000 volte) (Mengeling et al., 1984). Il ceppo KBSH, anche se antigenicamente correlato al ceppo NADL-8, pare essere un ceppo non patogeno, non avendo provocato né morte fetale post inoculo in utero, né viremia e trasmissione post inoculazione orale (Molitor et al., 1985). I ceppi patogeni Kresse e IAF-A54 sono invece stati anch'essi isolati per la prima volta negli USA, specificatamente in suini che presentavano una dermatite con lesioni simil-vescicolari (Kresse et al., 1985). Questi ceppi sono ancor più virulenti di quelli appena citati, in quanto letali anche per i feti dopo il 70° giorno di gestazione (Choi et al., 1987).

Tabella 1: Viremia, trasmissione transplacentare e morte causate da alcuni ceppi di PPV1 (Truyen & Streck, 2019).

Ceppo	Viremia post inoculazione orale	Morte fetale post inoculo intrauterino	Trasmissione transplacentare post somministrazione orale	Morte dei feti immunocompetenti
NADL-2	-	+	-	-
NADL-8	+	+	+	-
Kresse	+	+	+	+
KBSH	-	-	-	-

Tra gli innumerevoli virus di campo che sono stati sequenziati negli anni, particolarmente interessante è il ceppo tedesco 27a, isolato per la prima volta in Germania nel 2001 (Zimmermann et al., 2006). Rapidamente diffusosi in Europa, e probabilmente anche a livello globale, esso ha dato origine ad una serie di nuovi *27a-like viruses* (Truyen & Streck, 2019). Viste le specifiche sostituzioni nucleotidiche e amminoacidiche della proteina strutturale VP1, studi filogenetici hanno suggerito l'esistenza di un nuovo cluster filogenetico formato da questi nuovi ceppi (Zimmermann et al., 2006). La comparsa dei virus *27a-like* è degna di attenzione in quanto i relativi cambiamenti nelle proteine capsidiche potrebbero influenzare le proprietà antigeniche del virus. Nello specifico, virus appositamente costruiti contenenti le sostituzioni dei virus *27a-like*, hanno mostrato una maggiore efficienza replicativa rispetto ai classici ceppi NADL-2 e Kresse (Truyen & Streck, 2019). Questo potrebbe aver contribuito alla vasta distribuzione e predominanza di questi nuovi ceppi. Data la sua diffusione e patogenicità, il 27a è considerato da alcuni autori un ceppo di riferimento insieme agli statunitensi NADL-2 e Kresse (Truyen & Streck, 2019) nella definizione dell'albero filogenetico del PPV1.

Il numero crescente di studi filogenetici susseguitosi negli ultimi anni è il risultato di un particolare interesse nei confronti dei nuovi profili capsidici rilevati, frutto della variabilità genetica che sembrerebbe caratterizzare il parvovirus suino (Streck et al., 2015). Da questi studi è stato possibile, inoltre, raggruppare in 7 diversi *cluster/cladi* i vari ceppi virali sinora isolati (Figura 6).

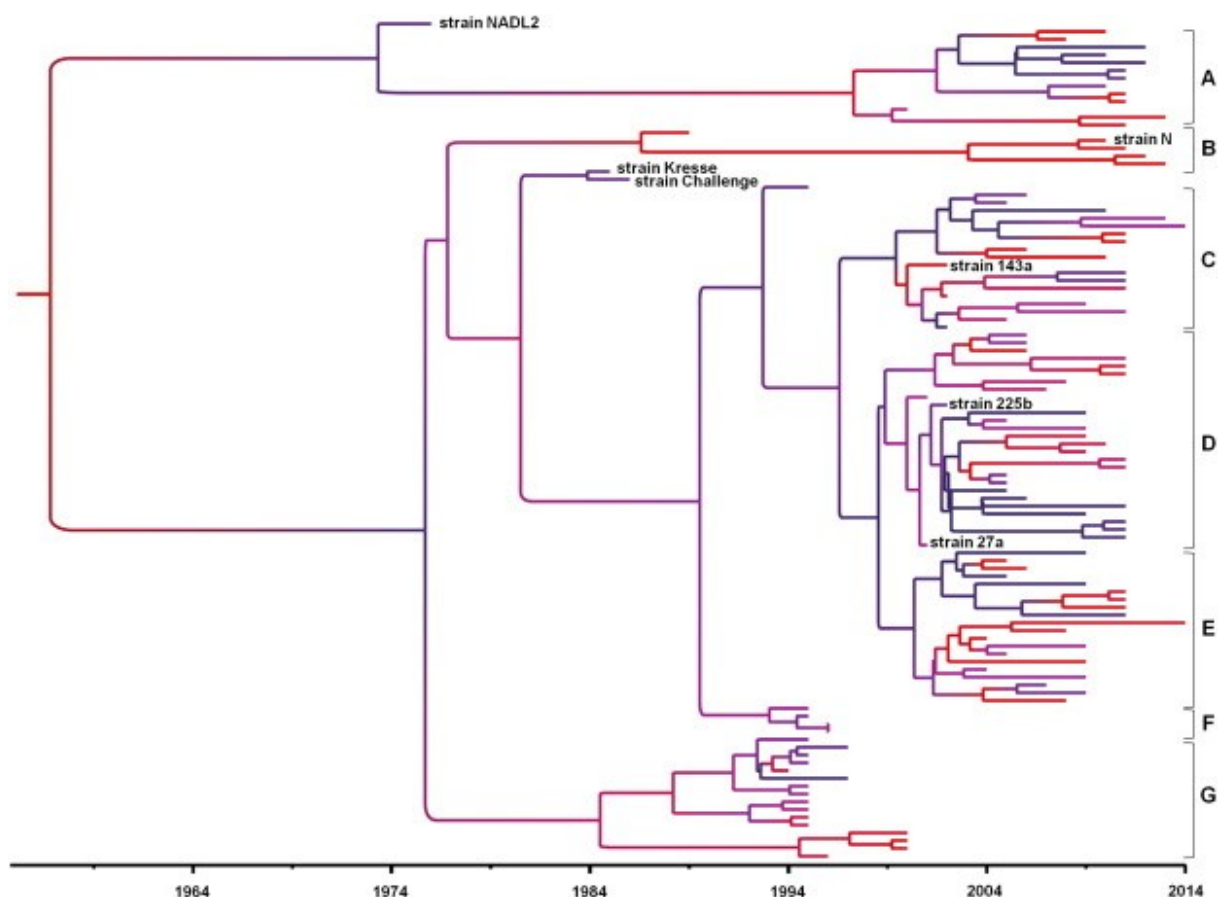


Figura 6: Albero filogenetico del PPV costruito in base alla sequenza parziale del gene VP1. L'asse della scala indica la distanza in anni. Le confidenze è indicata in base al colore dei rami (il blu per una confidenza minore, il rosso per una confidenza maggiore) (Streck et al., 2015).

Il primo studio che ha approfondito la variabilità genetica degli isolati di campo del PPV1, fu pubblicato nel 2003 e prese in considerazione ceppi isolati in Brasile dal 1994 al 2000 (Rodrigo Martins Soares et al., 2003): in questo lavoro venne analizzato un frammento parziale del gene codificante la proteina VP2, e i ceppi così identificati sono andati a costituire parte di due gruppi filogenetici distinti (F e G). Successivamente nel 2006, Zimmermann et al., analizzando dei campioni raccolti nel 2001 e nel 2002 in Germania, hanno descritto nuovi profili virali che hanno permesso così di distinguere altri due nuovi *cluster* (C e D). In anni seguenti, studi su ceppi isolati da casi clinici riscontrati in diversi paesi, tra i quali Austria, Cina, Romania e Svizzera, hanno descritto anch'essi nuovi profili e nuovi *cluster* identificati con le lettere A, B ed E (Hao et al., 2011; Shangjin et al., 2009; Streck et al., 2011; Streck et al., 2013), anche se la maggior parte dei ceppi analizzati provenienti dai suini domestici sono stati classificati come appartenenti ai cluster C e D in Europa e al *cluster* F in Cina. Lo stesso non si può dire per i cinghiali, in cui le sequenze erano piuttosto diverse e mostravano un diverso *clustering* (Cadar et al., 2012).

In quanto target principale della risposta immunitaria dell'ospite, la struttura capsidica assume un ruolo cardine nell'insorgenza di nuovi ceppi virali di PPV (Simpson et al., 2002): è stato infatti osservato che singole sostituzioni amminoacidiche possono influenzare la capacità di uno specifico isolato virale di replicare in certe linee cellulari, con differenze significative in termini di spettro d'ospite, tropismo tissutale e virulenza (Hueffer & Parrish, 2003; Streck et al., 2015). La variabilità riscontrata nei profili capsidici ha permesso di individuare i diversi *cluster* appena descritti e di evidenziarne i rapporti filogenetici. Per quanto concerne le differenze in termini di patogenicità tra il ceppo NADL-2 (GenBank accession no. L23427) e il ceppo virulento Kresse (U44978), nonostante non ne sia ancora stata definita la base genetica, sembra che essa debba essere ricercata nei geni che codificano per le proteine strutturali, in particolare per VP2 (Bergeron et al., 1996). Lo studio condotto da Bergeron et al. (1996) mostra come i genomi di questi due ceppi siano pressoché identici a livello di *non-coding region* e come tutte le sostituzioni nucleotidiche riscontrate a livello dei geni codificanti le proteine NS siano sinonimo. Al contrario, sei delle otto sostituzioni localizzate a livello dei geni delle proteine strutturali VP1 e VP2 portano ad un diverso amminoacido durante la traduzione. Più precisamente, confrontando questi risultati con diversi virus di campo, tra i 529 amminoacidi che compongono la VP2, cinque tra quelli derivanti dalla sostituzione nucleotidica vengono riscontrati in maniera costante nei ceppi virulenti, Kresse compreso, (I-215 → T, D-378 → G, H-383 → Q, S-436 → P, and R-565 → K), e tre di questi (D-378 → G, H-383 → Q, S-436 → P) sono considerati responsabili delle differenze nel tropismo tissutale osservato *in vitro* (Bergeron et al., 1996). Questi risultati non sono stati sufficienti a dimostrare il ruolo della struttura capsidica nel determinare le differenze osservate *in vivo* tra NADL-2 e Kresse, ma è stato proposto un ruolo analogo a quello del capside di MVMi/MVMp (minute virus of mice *prototype strain* e *immunosuppressive variant*) e CPV/FPV (Antonietti et al., 1988; Chang et al., 1992; Parrish, 1991; Parrish & Carmichael, 1986; Tsao et al., 1991).

Suggerendo un ruolo centrale ed esclusivo della struttura capsidica nel tropismo del virus, lo studio di Bergeron et al. va però in contrasto con il risultato del lavoro di Vasudevacharya e Compans (1992), che sono riusciti ad ottenere una variante di PPV1 con spettro d'ospite esteso a cellule canine, attraverso due sole sostituzioni, una delle quali nel gene che codifica per le proteine NS; l'altra nel gene codificante per quelle capsidiche (Vasudevacharya & Compans, 1992). Un altro lavoro che ha sfruttato la cristallografia a raggi X per studiare la struttura tridimensionale dei capsidi dei diversi fenotipi di PPV, ha dimostrato come questa sia molto

simile a quella dei parvovirus canini e felini (Simpson et al., 2002), virus che vedono le proteine capsidiche VP1/VP2 come le uniche vere responsabili dello spettro d'ospite (Chang et al., 1992; Shackelton et al., 2005; Truyen et al., 1995). Anche se non è una conferma, queste evidenze avvalorano la speculazione basata su studi in vitro e sull'analogia con CPV e MVM (Bergeron et al., 1996), più specificatamente irrobustendo l'ipotesi che probabilmente le differenze nel tropismo cellulare siano da associare esclusivamente alle tre sostituzioni amminoacidiche sopra descritte. L'analisi cristallografica ha inoltre confermato che le differenze nei tre amminoacidi di VP2, associate al fenotipo patogeno Kresse, sono tutte localizzate sulla parte più superficiale della struttura capsidica (Simpson et al., 2002), rafforzandone il ruolo antigenico. In particolare, gli amminoacidi 378, 383 e 565 sono localizzati vicino ai 2 *fold-axis* della superficie capsidica, siti importanti per la risposta immunitaria e per l'attività emoagglutinante (Bergeron et al., 1996). Anche i 3 *fold-spikes* sono coinvolti, in quanto gli amminoacidi in posizione 436 e 215 sono situati rispettivamente al centro e alla base di questa struttura capsidica (Chapman & Rossmann, 1993). Più recentemente, analizzando tutte le sequenze disponibili su GenBank, si è riscontrato che la maggior parte delle sostituzioni amminoacidiche delle proteine strutturali sono non conservative e interessano principalmente modifiche in termini di struttura e polarità; comparando inoltre i ceppi NADL-2 e Kresse, si distribuiscono equamente tra i *loop* e i β -foglietti (Streck et al., 2011; Streck et al., 2015). Lo studio di Streck et al. (2011) è stato però condotto anche su recenti isolati di campo di PPV individuati in Austria, Brasile, Germania e Svizzera, in cui sono state evidenziate nuove sostituzioni amminoacidiche, localizzate principalmente a livello dei *loop* delle proteine strutturali che compongono la superficie capsidica virale (Figura 6). I virus *27a-like*, ad esempio, sono caratterizzati da specifiche sequenze nel gene codificante le proteine strutturali, da cui ne derivano specifici cambiamenti amminoacidici in posizione 414, 419 e 436, localizzati principalmente a livello dei *loop*. Quest'ultimi sono situati generalmente sulla superficie capsidica, per cui potenzialmente potrebbero influenzarne il legame coi recettori e/o l'antigenicità. Che le sequenze che codificano per le strutture capsidiche più esposte siano meno conservate rispetto a quelle che codificano per le regioni capsidiche più interne, è stato confermato paragonando sia FPV, CPV e PPV, che singoli ceppi di PPV a diversa patogenicità (Simpson et al., 2002; Streck et al., 2011).

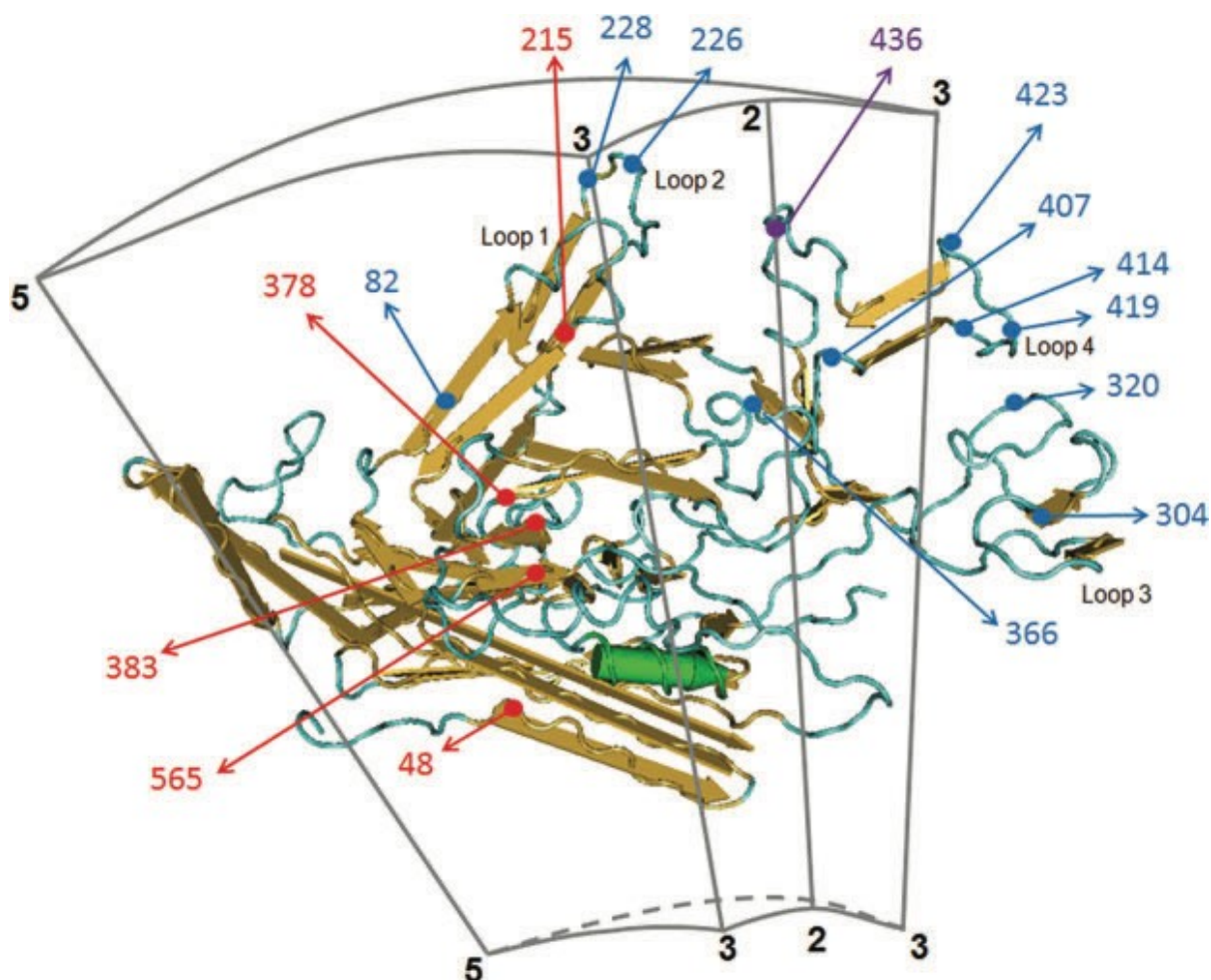


Figura 7: Modello tridimensionale della struttura secondaria della proteina VP2 con un' α -elica (freccia verde) e diversi β -foglietti (freccie gialle) (struttura adattata da Chapman & Rossmann, 1993). Nello specifico, vengono qui rappresentati i 5-3-2 fold axis della subunità capsidica, che sono tra loro vicini. I punti rossi indicano le differenze amminoacidiche tra i ceppi NADL-2 e Kresse. Solo il 436 è rappresentato in viola. I punti blu sono invece i siti di sostituzione dei nuovi ceppi (Streck et al., 2011).

Se sul lato del tropismo cellulare, tutte e tre le sostituzioni amminoacidiche sembrano essere coinvolte in maniera esclusiva, sul versante *patogenicità* questo deve ancora essere chiarito del tutto (Streck et al., 2011), nonostante sia ormai chiaro il ruolo centrale rivestito dalla struttura capsidica, in particolare dalle parti più esposte di VP2.

Per quanto non siano ancora stati definiti i determinanti di virulenza, anche in questo caso è probabile che la base genetica causale sia confinata a livello delle proteine strutturali: in particolare, prima Bergeron et al. (1996), poi Simpson et al. (2002) e Soares et al. (2003), hanno osservato nel ceppo NADL2 una ripetizione di 127 nucleotidi, immediatamente dopo l'ORF 3', in corrispondenza del gene VP1, assente invece nei virus patogeni. I risultati ottenuti da Zimmermann et al. (2006) hanno confermato questa ipotesi: tutti i recenti ceppi di campo isolati da casi clinici in Germania [27a, 143a e IDT (MSV)] non presentavano infatti questa

ripetizione. È anche vero però che gli stessi ceppi IDT (MSV) e 143a, anche se privi dei 127 nucleotidi ripetuti, non hanno mostrato un comportamento patogeno in condizioni sperimentali (Zeeuw et al., 2007). Nonostante si possa affermare che sia improbabile che questa ripetizione definisca la virulenza dei PPV, lo studio condotto da Fernandes et al. (2011) suggerisce che questa regione potrebbe interagire con la superficie capsidica interna, e possibilmente influenzare l'incapsidazione del DNA virale. È inoltre necessario sottolineare come i cambiamenti relativi alla struttura capsidica virale non necessariamente portino ad una diversa antigenicità, potendone potenzialmente anche influenzare la virulenza: 3 dei 6 diversi amminoacidi per cui si differenzia il ceppo non virulento NADL2 da quello virulento Kresse sono infatti situati in corrispondenza dei β -foglietti (fig. 1). I 3 siti in questione si trovano più vicino al centro del capside del PPV rispetto ad altri siti capsidici variabili: questo tipo di sostituzioni potrebbero potenzialmente influenzare l'assemblaggio delle proteine e l'impacchettamento del DNA virale, rendendo più efficiente la replicazione ed eventualmente aumentarne la virulenza (Streck et al., 2015).

La maggior parte delle sostituzioni amminoacidiche sinora descritte, essendo così esposte sulla superficie capsidica, possono influenzare le interazioni del virus coi recettori cellulari e/o la relativa antigenicità (Streck et al., 2015), mettendo così in dubbio l'efficacia dei vaccini attualmente utilizzati contro il PPV. Zeeuw et al. (2007) hanno messo in evidenza questo fenomeno, inoculando due isolati di campo tedeschi in Germania (PPV-27a e PPV 143a) e due virus vaccinali (PPV-NADL2 e PPV-IDT/MSV) in scrofe gravide al 40° giorno di gestazione, per testare la capacità di neutralizzazione omologa ed eterologa del siero. Tutti i sieri hanno registrato un'alta attività di neutralizzazione contro i virus omologhi, ma bassa contro il ceppo di campo prevalente in Germania (27a). Le sostituzioni amminoacidiche localizzate in corrispondenza dei *3-fold spikes* probabilmente sono la causa dell'appena descritta riduzione di affinità da parte degli anticorpi neutralizzanti (Zeeuw et al., 2007). Questi ultimi hanno un ruolo predominante per la protezione contro l'infezione da parvovirus, e siccome la loro attività di riconoscimento antigenico dipende da interazioni elettrostatiche, quali ad esempio legami a idrogeno o forze a corto raggio come le forze di van der Waals, anche minimi cambiamenti strutturali nel patogeno possono influenzare la capacità neutralizzante anticorpale. Diverse sono le previsioni inerenti alle sostituzioni amminoacidiche che potrebbero essere responsabili della comparsa di nuovi profili elettrostatici della superficie capsidica (es. protuberanze idrofobiche, interazioni tra *loop*, aumentata polarità di superficie). Non bisogna però dimenticare che questi

modelli sono solo delle previsioni e che soltanto la cristallografia o la microscopia crioelettronica sono in grado di sviscerare l'esatta struttura di ogni ceppo virale sinora qui descritto (Streck et al., 2015).

1.4.3 Le nuove specie di PPV

Negli ultimi 20 anni, grazie allo sviluppo di nuove tecnologie molecolari, come ad esempio il Next Generation Sequencing, nuove specie di PPV sono state identificate e descritte per la prima volta (Milek et al., 2019; Streck et al., 2015). Nella più recente classificazione tassonomica proposta dall'ICTV, i nuovi porcine parvovirus 2 (PPV2) e 3 (PPV3) sono stati inclusi nel genere *Tetraparvovirus*, specie *Ungulate tetraparvovirus 3* e 2 rispettivamente, mentre il porcine parvovirus 4 (PPV4) fa parte del genere *Copiparvovirus*, e della relativa specie *Ungulate copiparvovirus 2* (Cotmore et al., 2019). Il porcine parvovirus 6 (PPV6), nonostante non sia ancora stato classificato dall'ICTV, è stato provvisoriamente inserito nello stesso genere del PPV4 (*Copiparvovirus*), nella specie *Ungulate copiparvovirus 4* (Pénzes et al., 2020). Lo stesso vale per il porcine parvovirus 5 (PPV5), le cui analisi genetiche hanno però evidenziato una maggior somiglianza con la specie PPV4 (Xiao, Giménez-Lirola, et al., 2013), rispetto al PPV6. Anche il più recente porcine parvovirus 7 (PPV7) non ha ancora ricevuto una classificazione, anche se è necessario sottolineare come esso sia solo lontanamente correlato con gli altri porcine parvovirus; per questo motivo è stato proposto di inserirlo nella nuova sottofamiglia *Hamaparvovirinae*, nel nuovo genere *Chaphamaparvovirus*, come unico membro della specie *Ungulate chaphamaparvovirus 1* (Pénzes et al., 2020).

Il PPV2, amplificato accidentalmente durante un'indagine sul virus dell'epatite E in Myanmar, è stato il primo ad essere stato individuato tra le nuove specie di parvovirus suino (Hijikata et al., 2001). Esso mostrava una certa similarità genetica con il Muscovy duck parvovirus e con il bovine parvovirus 3, anche se filogeneticamente appariva distinto da qualsiasi altro membro sino ad allora conosciuto della sottofamiglia *Parvovirinae*. Questo fino a quando in Cina, diversi anni dopo, nel siero di suini affetti da “*high fever disease*” (in associazione con la PRRS e/o PMWS) non sono stati scoperti nuovi parvovirus geneticamente molto simili al PPV2, costituendo insieme un nuovo *sublineage* all'interno della sottofamiglia *Parvovirinae* (F. Wang et al., 2010).

Nel 2008 ad Hong Kong, è stato individuato un nuovo porcine parvovirus, il porcine hokovirus (PHoV), poi inserito nel nuovo genere degli *Hokovirus*. Le relative sequenze hanno messo in

evidenza una certa parentela con il human parvovirus 4 (PARV4) e con il bovine hokovirus (BHoV), costituendo un nuovo *cluster* della famiglia *Parvoviridae* (Lau et al., 2008). Cheung et al. (2010) hanno poi proposto di rinominare il porcine hokovirus come porcine parvovirus 3 (PPV3). Il PPV3 è stato identificato in molti paesi (inclusi Hong Kong, Romania, Germania, USA, Cina, Polonia) sia nel suino domestico (Cságola et al., 2012; Miłek et al., 2019; Pan et al., 2012; Szelei et al., 2010; Xiao et al., 2012) che nel cinghiale (Adlhoeh et al., 2010; Cadar et al., 2011; Streck et al., 2013), suggerendone così un'ampia distribuzione: nei cinghiali è stato riscontrato con prevalenze molto elevate (50,54%).

Il porcine parvovirus 4 è stato per la prima volta individuato nel 2005 in gruppi di suini affetti da Porcine circovirus associated disease (PCVAD) negli USA (Cheung et al., 2010), e successivamente anche in Cina (L. Huang et al., 2010; Zhang et al., 2011), Ungheria, Romania, Polonia, Camerun e altri paesi (Cadar et al., 2013; Cságola et al., 2012; Cui et al., 2017; Ndze et al., 2013). Le nuove specie di porcine parvovirus sinora qui descritte presentano l'organizzazione genomica tipica dei membri della famiglia *Parvovirinae*. Questo non vale però per il PPV4, il quale presenta un ORF aggiuntivo (ORF3), situato tra l'ORF1 e l'ORF2; questa regione genica è tipica dei membri del genere *Bocaparvovirus*. Nonostante ciò, la nucleoproteina codificata dall'ORF3 del PPV4 è alquanto caratteristica, per cui la similarità amminoacidica con la corrispondente proteina degli altri membri del genere *Bocaparvovirus* risulta piuttosto limitata (Cheung et al., 2010; L. Huang et al., 2010). Lo studio di Cadar et al. (2013), a partire dalla sequenza amminoacidica codificata da ORF2, ha evidenziato un'elevata distanza filogenetica tra PPV4 e i bocaparvovirus conosciuti (Cadar et al., 2013). Solo recentemente il PPV4 è stato associato al genere *Copiparvovirus* (Cotmore et al., 2019).

Nel 2013, durante un'indagine svolta per approfondire la prevalenza del PPV4 nei suini statunitensi, un nuovo PPV strettamente legato al PPV4 è stato rilevato a livello polmonare e poi nominato come PPV5 (Xiao, Giménez-Lirola, et al., 2013). Il PPV5 è stato individuato nei polmoni di suini di età diverse, ma nessun caso era associato a segni clinici; la sua presenza è stata poi riportata anche in Cina e Polonia (Cui et al., 2017; Wu et al., 2014).

Il PPV6 è stato invece descritto per la prima volta in Cina nel 2014, dove è stato individuato in campioni raccolti tra il 2010 e il 2013 da feti abortiti, suinetti, suini adulti e scrofe (Ni et al., 2014), in cui la prevalenza nei feti abortiti e nei suinetti (50% e 75% rispettivamente) è risultata maggiore rispetto a quella dei suini adulti e delle scrofe (15,6% e 3,8% rispettivamente),

indipendentemente dalla loro condizione clinica. Questi risultati suggeriscono che l'età degli animali possa influenzare significativamente il livello di viremia, probabilmente a causa del diverso sviluppo dell'immunità specifica (Klinge et al., 2009). La prevalenza del PPV6 nei suini adulti, infatti, era simile tra allevamenti che presentavano la malattia e allevamenti clinicamente sani (16,7% vs 13,6%-21,7%).

Negli anni seguenti la sua presenza è stata riportata anche negli USA e in Polonia (Cui et al., 2017; Schirtzinger et al., 2015). Il PPV6 possiede un genoma di 6,1 kb, più lungo rispetto a quello del "classico" PPV1, e analisi filogenetiche hanno messo in evidenza delle differenze significative nella composizione amminoacidica rispetto agli altri parvovirus conosciuti, sottolineando però una certa parentela con il PPV4. Tenendo conto degli ultimi criteri dell'ICTV per l'attribuzione di un virus ad un genere nella famiglia *Parvovirinae*, che prevedono che membri dello stesso genere siano monofiletici e possiedano più del 30% di amminoacidi della proteina NS1 identici e al tempo stesso una somiglianza inferiore al 30% con gli altri generi, il PPV6 e PPV5, sono stati classificati come nuove specie appartenenti al genere *Copiparvovirus* (Cotmore et al., 2014, 2019).

Nel 2016, Palinski et al. hanno descritto una nuova specie appartenente alla sottofamiglia *Parvovirinae*, il PPV7. L'analisi metagenomica di tamponi rettali in pool, raccolti da suini adulti senza segni clinici in allevamenti statunitensi, e la successiva comparazione nucleotidica e amminoacidica (BLASTP analysis) hanno messo in evidenza una certa similarità genetica del PPV7 con il parvovirus 2 del pipistrello della frutta (*Eidolon helvum parvovirus 2*, EhPV2) e con il turkey parvovirus (TuPV). Le analisi genetiche e filogenetiche hanno inoltre identificato una certa divergenza con gli altri parvovirus sinora descritti, suggerendo quindi che PPV7, EhPV2 e TuPV dovrebbero essere classificati all'interno della famiglia *Parvoviridae*, proponendo il nuovo genere *Chappaparvovirus* (*Chiroptera, Avian and Porcine*), con il PPV7 come *type species*, in quanto è l'unico membro in cui è stata descritta la relativa sequenza codificante completa del DNA (Palinski et al., 2016). Il PPV7 è stato identificato poi anche in Cina, con un'omologia nucleotidica del 98,7%-99,7% con il virus identificato negli USA (Xing et al., 2018), in Polonia e Corea (Milek et al., 2018; Ouh et al., 2018).

1.4.4 Epidemiologia delle nuove specie di PPV

Come già anticipato, il PPV1 è endemico nella maggior parte del mondo: indagini sierologiche in diversi paesi hanno evidenziato anticorpi contro PPV1 nel 70-100% degli allevamenti.

Questo valore di risposta anticorpale va però interpretato cautamente alla luce dell'uso diffuso dei vaccini (Foni & Gualandi, 1989; Nash, 1990; Oravainen et al., 2005; Truyen & Streck, 2019). Il test di inibizione dell'emoagglutinazione condotto da Oravainen et al. (2005), ha evidenziato un titolo anticorpale ≥ 512 (valore tipico in caso di infezione di campo) in circa il 40% degli animali vaccinati.

Diversi studi hanno rilevato un'ampia distribuzione geografica anche per i più recenti PPV. Tutte le specie di PPV sono state individuate in Cina, Stati Uniti e Polonia (Cadar et al., 2013; Cui et al., 2017; Miłek et al., 2018; Ni et al., 2014; Opriessnig et al., 2014; Palinski et al., 2016; Schirtzinger et al., 2015; Sun et al., 2015; Wu et al., 2014; Xing et al., 2018). Molti sono gli studi che hanno riportato la presenza di PPV2, PPV3 e PPV4 anche in Ungheria, Romania, Thailandia, Giappone e Sud Africa (Afolabi et al., 2019; Cadar et al., 2013; Cságola et al., 2012; Saekhow et al., 2016; Saekhow & Ikeda, 2015). PPV3, PPV4 e PPV7 sono stati inoltre descritti nel Regno Unito, in Brasile e in Corea rispettivamente (Gava et al., 2015; Ouh et al., 2018; Szelei et al., 2010).

Sino ad ora, non è stata attribuita alcuna rilevanza clinica ai nuovi PPV identificati; l'alta prevalenza di questi virus in tessuti specifici di animali clinicamente sani, suggeriscono una possibile relazione di commensalismo con l'ospite (Streck et al., 2015). Nello specifico, le nuove specie di PPV sono state identificate sia in animali sani che clinicamente malati (Cságola et al., 2012; L. Huang et al., 2010; Ni et al., 2014; F. Wang et al., 2010; Xiao et al., 2012), in diverse matrici, compreso siero, feci, fegato, polmone, cuore, milza, rene, linfonodi, tonsille e feti abortiti (Lau et al., 2008; Miłek et al., 2019; Ni et al., 2014; Xiao et al., 2013; Xiao, Giménez-Lirola, et al., 2013). Le diverse specie di PPV sono inoltre state individuate sia nel suino domestico che nel cinghiale, suggerendo così un probabile flusso di patogeni tra queste due popolazioni (Adlhoch et al., 2010; Cadar et al., 2011; Cadar, et al., 2013; Hijikata et al., 2001; Streck et al., 2013; Xiao, Giménez-Lirola, et al., 2013). Materiale genetico appartenente a PPV è stato rilevato in alcuni ratti (*Rattus norvegicus*), i quali presentavano anche un'infezione produttiva (Cutler et al., 1982; Streck et al., 2015). Il PPV è inoltre in grado di replicare in cellule immortalizzate sia di origine bovina che umana, il che potrebbe far sospettare uno spettro d'ospite più ampio di quello previsto (Streck et al., 2015).

Nonostante i PPV2-7 siano stati rilevati in diversi paesi, la loro rilevanza clinica ed epidemiologica di base, incluse le vie di trasmissione, patogenesi, segni clinici e lesioni, non è

ancora stata chiarita, in quanto mai isolati in colture cellulari e mai utilizzati per infezioni sperimentali (Milek et al., 2019; Truyen & Streck, 2019); per questo motivo questi aspetti verranno supportati dagli studi condotti sul PPV1. È opportuno però sottolineare che la rilevanza di qualsiasi virus potrebbe essere stimata analizzandone la circolazione negli allevamenti in diverse regioni, nazioni, tipologie di produzioni e a seconda dello status sanitario (Milek et al., 2019). Sfortunatamente la maggior parte dei risultati pubblicati sui nuovi PPV sono il frutto di analisi condotte su campioni di archivio, in alcuni casi privi di descrizione della condizione clinica dell'animale e conferiti ai laboratori diagnostici per l'attività diagnostica di routine svolta in caso di sospetto di infezione virale e/o batterica, così come su campioni raccolti casualmente al macello (Cadar et al., 2013; Cságola et al., 2016; Cui et al., 2017; Ni et al., 2014; Opriessnig et al., 2014; Saekhow et al., 2016; Saekhow & Ikeda, 2015; Schirtzinger et al., 2015; Xiao et al., 2013). Solo alcuni studi (Cui et al., 2017; Milek et al., 2018) hanno fornito un'analisi sistematica sulla circolazione dei vari PPV in diversi allevamenti. Testare diversi matrici diagnostiche raccolte dalle stesse popolazioni di animali con un metodo standardizzato, permette infatti di avere a disposizione informazioni dettagliate sulla dinamica di circolazione in allevamento dei diversi PPV, il che potrebbe contribuire a definirne la biologia, l'epidemiologia e a meglio comprenderne il ruolo in co-infezione con altri patogeni (Milek et al., 2019).

1.4.5 Meccanismi e tasso di evoluzione virale

La rapida insorgenza di nuovi ceppi di PPV sopra descritta sembra apparentemente non essere in linea con la stabilità genetica teoricamente attribuita ai virus a DNA, soprattutto quando paragonati a quelli ad RNA. È proprio a causa di questo ipotizzato “comportamento conservativo” che tra gli anni '80 e '90 il parvovirus non fu soggetto ad un attento monitoraggio evolutivo (Streck et al., 2015). Questa ipotesi deriva dal fatto che i virus a DNA sfruttano per la loro replicazione la DNA polimerasi della cellula ospite, la quale è dotata di un'intrinseca efficiente attività di riparazione nel caso di errori nel processo di replicazione. Quest'alta confidenza nella generazione di nuove copie di DNA da parte dell'ospite si rifletterebbe così anche nel virus a DNA, con un conseguente basso tasso di sostituzione nucleotidica (circa 10^{-9} - 10^{-10} sostituzioni/nucleotide/anno). Al contrario, i virus a RNA, codificando per la propria RNA polimerasi, priva di attività *proofreading*, sono fisiologicamente più mutevoli; il tasso di sostituzione dei virus a RNA si aggira infatti attorno a 10^{-3} - 10^{-5} sostituzioni/sito/anno (Drake, 1993; Duffy et al., 2008). Recenti studi sulle dinamiche di mutazione hanno però messo in

evidenza come ci potrebbero essere dei fattori aggiuntivi, quali ad esempio l'architettura genomica, la velocità di replicazione, la specie ospite, il meccanismo stesso di replicazione, etc., che potrebbero influenzare il tasso di mutazione virale (Duffy et al., 2008; Xia & Yuen, 2005): questo potrebbe spiegare come alcuni virus a DNA (principalmente quelli dotati di DNA a singolo filamento, in quanto presentano un tasso di deaminazione spontanea 100 volte superiore) evolvano rapidamente, mentre altri virus ad RNA risultano più stabili (Duffy et al., 2008). È lo studio di Shackelton et al. (2005) ad aver fornito una prima stima precisa del tasso evolutivo dei virus a ssDNA, nel quale è stata ben documentata l'emergenza del canino parvovirus type 2 (CPV-2) dal feline parvovirus (FPV). Per entrambi i virus venne stimato un tasso di sostituzione di circa 10^{-4} sostituzioni/sito/anno, valore che rientra perfettamente nel range normalmente attribuito ai virus ad RNA (Shackelton et al., 2005). Successivamente, anche per altri virus a ssDNA è stato descritto un alto tasso di sostituzione nucleotidica, inclusi il human parvovirus B19 (Norja et al., 2008; Shackelton & Holmes, 2006), il circovirus sen-V (Umemura et al., 2002), il tomato yellow leaf curl virus (Duffy & Holmes, 2008) e l'infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (Robles-Sikisaka et al., 2010), suggerendo così che gli alti tassi di mutazione potrebbero essere una caratteristica propria di tutti i parvovirus autonomi (Streck et al., 2015).

Molti sono i meccanismi evolutivi che potrebbero esercitare un ruolo importante nell'evoluzione dei parvovirus: la coevoluzione virus-ospite, i salti di specie e adattamento, la trasmissione inter- o intraspecie, la ricombinazione e le pressioni selettive sono solo alcuni dei meccanismi proposti (Cadar et al., 2012; Lukashov & Goudsmit, 2001; Shackelton et al., 2005, 2007; Streck et al., 2011). I meccanismi evolutivi responsabili di questa eterogeneità sono quindi sì dibattuti, ma sembrerebbe che le mutazioni puntiformi e il processo di ricombinazione possano essere i più plausibili. Il processo di ricombinazione è stato recentemente proposto per i porcine parvovirus sia da Cadar et al. (2013), per spiegare delle incongruenze filogenetiche, che da Shackelton et al. (2007), anche se rimane ancora da chiarire come questo meccanismo possa essere coinvolto nella determinazione dell'evoluzione dei parvovirus (Streck et al., 2015). Anche le mutazioni puntiformi potrebbero essere tra i meccanismi coinvolti nell'evoluzione dei virus a ssDNA. Se da un lato è vero che i virus a DNA, sfruttando la DNA polimerasi dell'ospite, dovrebbero dividerne anche la stessa stabilità genetica, dall'altro lato potrebbe essere plausibile una impossibilità dell'esonucleasi dell'ospite di riparare il genoma dei parvovirus, a causa dei diversi pattern di metilazione che li caratterizzano; questo potrebbe

quindi determinare un maggiore tasso di mutazione durante la replicazione del DNA virale (Duffy et al., 2008). Un meccanismo alternativo potrebbe prevedere invece il reclutamento, da parte del genoma dei parvovirus, di una polimerasi *error-prone* (come ad esempio una polimerasi priva di un meccanismo di riparazione esonucleasico) al nucleo della cellula ospite per la propria replicazione (Garcia-Diaz & Bebenek, 2007).

Il PPV, prima del 2011, era un virus il cui genoma era considerato più conservato rispetto agli altri parvovirus e virus a ssDNA (Duffy et al., 2008; López-Bueno et al., 2006; Lukashov & Goudsmit, 2001). La prima analisi sull'evoluzione del PPV nei suini allevati in maniera intensiva è stata condotta nel 2011 (Streck et al., 2011), affiancata poi da uno studio simile condotto però sui cinghiali (Cadar et al., 2012). Sia nel suino domestico che nel cinghiale i tassi di mutazione rilevati sono apparsi alti (circa $3-5 \times 10^{-4}$) nei geni codificanti le proteine strutturali, mentre in quelli per le non strutturali il tasso di evoluzione è più moderato (circa 10^{-5}). Secondo l'analisi filogenetica con orologio molecolare, è stato osservato come gli ultimi 10-30 anni prima del 2011 siano stati teatro dell'introduzione delle principali divergenze riscontrate nei nuovi isolati virali (Cadar et al., 2011; Streck et al., 2011). Nello specifico, le analisi cronologiche dei dataset di sequenze di NS1 e VP1 condotte da Streck et al. (2011) descrivono due periodi temporali distinti: gli eventi principali che hanno portato all'insorgenza di nuovi ceppi, considerando le differenze nel gene VP1, sono da ricercare negli ultimi 20 anni precedenti al 2011, mentre per le proteine non strutturali, si stima che le divergenze siano concentrate principalmente negli ultimi 30-60 anni antecedenti al 2011 (data dello studio di Streck et al.). Questa "aggressività" nell'evoluzione, simile a quella descritta per i parvovirus dei carnivori e dell'uomo, suggerisce come gli alti tassi di mutazione potrebbero essere tipici dei porcine parvoviruses (Streck et al., 2015).

1.4.5.1 Possibile influenza dei vaccini nell'evoluzione virale

Se da un lato i nuovi pattern amminoacidici descritti per i nuovi ceppi di PPV1 potrebbero riflettere un'effettiva evoluzione virale, dall'altro le più sensibili moderne tecniche diagnostiche potrebbero semplicemente aver consentito l'identificazione di un'ampia varietà di "vecchi" virus sinora non rilevabili (Streck et al., 2015). Nuovi profili capsidici con proprietà antigeniche distinte, anche in termini di cross-neutralizzazione degli anticorpi contro i virus vaccinali, sono stati descritti (Zeeuw et al., 2007). Questa evidenza, insieme al fatto che le principali divergenze tra ceppi virali sembrano essere state introdotte negli ultimi 10-30 anni

(Cadar et al., 2012; Streck et al., 2011), rafforza l'ipotesi che l'emergenza dei nuovi profili antigenici possa essere dovuta ad un adattamento virale promosso dai vaccini sinora ampiamente utilizzati. Questi nuovi ceppi rappresenterebbero così degli *escape mutant* in una popolazione parzialmente immune (Streck et al., 2015). Studi di dinamica di popolazione sono stati recentemente condotti per rispondere a questo quesito. Parallelamente alla progettazione di un modello *in vitro* che riproducesse la presunta selezione immunitaria (Streck et al., 2013), è stata condotta anche un'analisi *in silico*, che ha rivelato una moderata ma continua riduzione della varietà genetica dopo il 1985. L'utilizzo globale dei vaccini potrebbe essere una spiegazione plausibile a questo fenomeno, in quanto la riduzione della variabilità genetica sembra essere strettamente correlata ad una ridotta trasmissione virale (Van Ballegooijen et al., 2009). Tuttavia, è importante non dimenticare che la dinamica di popolazione può essere fortemente influenzata anche da altri processi non-evolutivi, quali ad esempio le misure sanitarie, la biosicurezza e la segregazione degli animali in diverse categorie produttive. Gli esiti del modello *in vitro*, in cui il PPV1 è stato fatto crescere in coltura, con e senza la pressione immunitaria esercitata da anticorpi neutralizzanti, hanno confermato quanto ipotizzato dall'analisi *in silico*, con i virus soggetti alla pressione anticorpale che hanno mostrato una minore diversità genetica rispetto al controllo (Streck et al., 2013). Lo studio condotto da Cadar et al. (2012) sui cinghiali, ha fornito un'ulteriore conferma di questa relazione tra evoluzione antigenica e varietà genetica: nella popolazione di cinghiali presa in esame come l'esempio perfetto di una popolazione non vaccinata, il PPV1 mostrava una maggiore variabilità genetica rispetto a quello presente nella popolazione domestica. Le misure sanitarie e la vaccinazione estensiva normalmente attuate nell'allevamento del suino domestico potrebbero svolgere un ruolo determinante nella riduzione della variabilità del PPV1 in queste popolazioni (Streck et al., 2015). Se da un lato l'introduzione e la rapida diffusione della vaccinazione possono aver promosso un collo di bottiglia sulla popolazione di PPV1, dall'altro l'uso estensivo di un vaccino che stimoli un'immunità non sterilizzante potrebbe essere stato determinante nella selezione di nuove varianti/specie virali, considerando anche la rapida evoluzione di questa sottofamiglia virale. La vaccinazione oggi è utilizzata col primario intento di proteggere dalla malattia e non impedisce infatti la trasmissione e la circolazione virale (Foerster et al., 2016; Jóźwik et al., 2009), creando lo scenario perfetto per l'antigenic escape alla base di una *vaccine-driven epitope evolution* (Read & Mackinnon, 2010).

1.4.6 Vie di trasmissione e patogenesi

La via di trasmissione di interesse dal punto di vista produttivo è principalmente quella transplacentare, anche se ovviamente la trasmissione orizzontale è alla base dell'introduzione del problema in azienda. Sebbene il PPV1 replichi facilmente in tutti gli individui immunologicamente suscettibili, i segni clinici si osservano soltanto nelle scrofe gravide.

La trasmissione orizzontale può avvenire direttamente, attraverso il contatto tra suini infetti e suini *naive*, e indirettamente, attraverso l'inalazione o l'ingestione del virus presente nelle secrezioni ed escrezioni animali (Mengeling et al., 2000): lo *shedding* del virus avviene tramite le feci e altre secrezioni dei suini con infezione acuta (Truyen & Streck, 2019), anche se non c'è evidenza che questo avvenga per un periodo di tempo prolungato (Mengeling et al., 2000). La caratteristica che modella l'epidemiologia del PPV1, risiede infatti nell'alta capacità del virus di resistere all'inattivazione nell'ambiente: è stato infatti dimostrato che il PPV1, una volta rilasciato nell'ambiente, è in grado di rimanere infettante fuori dall'ospite per almeno 4 mesi, quando, al contrario, lo *shedding* virale da parte di suini infetti in fase acuta sembrerebbe durare per poche settimane (Mengeling & Paul, 1986). Data l'alta stabilità ambientale, la trasmissione del virus tra diversi allevamenti, o gruppi di animali, può avvenire anche tramite fomiti, quali ad esempio l'attrezzatura utilizzata, vestiti e stivali; allo stesso modo, anche i roditori sono in grado di agire come vettori meccanici, introducendo così il patogeno in allevamento (Truyen & Streck, 2019).

Gli studi sulla rilevazione del PPV1 nel seme di verri infettati naturalmente sono numerosi (Cartwright & Huck, 1967; Mengeling et al., 2000; Ruckerbauer & Dulac Boulanger, 1978), motivo per cui si suppone che anche i verri infetti possano introdurre il virus in azienda, nonostante questi non manifestino alcun segno clinico. Detto ciò, non è ancora chiaro se il PPV1 venga effettivamente rilasciato nel seme o se si tratti semplicemente di una contaminazione ambientale (Streck & Truyen, 2020). Il verro, visto il suo possibile utilizzo come ruffiano, potrebbe potenzialmente fungere da *carrier* non infetto, muovendosi tra le scrofe infette e non infette (Mengeling et al., 2000).

All'interno di un gruppo di scrofe, se un numero sufficiente di animali possiede un'immunità sia naturale sia vaccinale, l'introduzione del PPV1 nell'allevamento non causa problemi nell'immediato. L'infezione da PPV1 ha generalmente le seguenti caratteristiche/fasi: al momento del parto, la maggior parte delle scrofe sono immuni e, tramite il colostro,

trasferiscono un alto titolo di anticorpi contro il PPV1 alla loro prole. L'immunità materna persiste per 4-6 mesi, diminuendo progressivamente. Durante questo periodo, i suinetti sono relativamente refrattari all'infezione (Paul et al., 1980, 1982) ma, con il graduale calo dell'immunità materna, hanno progressivamente una maggiore probabilità di essere infettati. Con l'infezione, i suinetti acquisiscono così un'immunità attiva, che sembrerebbe persistere per tutta la vita, probabilmente anche a causa di un'esposizione ripetuta al virus. Idealmente, se tutte le scrofette sviluppassero un'immunità attiva per esposizione naturale prima del concepimento, il parvovirus raramente rappresenterebbe un problema. Tuttavia, alcune scrofette sfuggono all'infezione, fino alla prima gravidanza. Se le scrofette vengono esposte per la prima volta al PPV1 durante la prima metà della gestazione, è molto probabile che si verifichi l'infezione transplacentare del feto e il conseguente *reproductive failure* (Joo et al., 1976; Mengeling & Cutlip, 1976).

Le prime fasi dell'infezione e il periodo di incubazione non sono ancora stati ben definiti dal punto di vista patogenetico. Apparentemente, il virus replica prima nelle tonsille e nelle cavità orale e nasale, per poi raggiungere il sistema linfatico dopo 1-3 giorni, provocando così una viremia *cell-free*. La trasmissione transplacentare e la conseguente infezione embrio/fetale, si verificherebbero, nelle femmine gravide immunologicamente suscettibili, circa 15 giorni dopo l'inoculazione del PPV1 (Brown et al., 1980; Mengeling, 1978; Paul et al., 1980).

La patogenesi del PPV1 riflette la capacità di quest'ultimo di infettare il feto (Mengeling et al., 2000), anche se non è chiaro come il PPV1 attraversi effettivamente la barriera transplacentare. Come è stato descritto per altri virus, il PPV1 potrebbe potenzialmente raggiungere il feto in tre diversi modi: attraverso i fluidi fetali (es. sangue e linfa), tramite la replicazione progressiva attraverso le cellule contigue e gli strati cellulari placentari, oppure trasportato all'interno di cellule, come ad esempio macrofagi o linfociti (Mengeling et al., 2000).

Un elemento da tenere in considerazione è che, nelle scrofe, la placenta è di tipo epitelio-coriale, composta quindi da 6 strati tissutali che separano completamente la circolazione materna da quella fetale. Questi strati, insieme alle cellule placentari strettamente connesse tra loro, impediscono il passaggio anche di molecole molto piccole, come ad esempio gli anticorpi. Inoltre, le cellule placentari non sono suscettibili all'infezione da PPV1 e questo è confermato anche dal fatto che esso non sia mai stato rilevato nei tessuti placentari. È quindi poco plausibile che il virus attraversi la barriera placentare tramite la replicazione progressiva attraverso i suoi

strati (Mengeling, 1978) e, viste le circolazioni separate, è possibile scartare anche l'ipotesi dei fluidi fetali (Mengeling et al., 2000). È invece più probabile che il PPV1 raggiunga il feto attraverso cellule immunitarie infettate dal virus. La sua presenza è stata descritta sia nei tessuti linfoidei dei suini adulti (Lucas et al., 1974; Mengeling et al., 2000) che nei linfociti fetali presenti nel sistema circolatorio delle scrofe gravide (Rudek & Kwiatkowska, 1983). Se da un lato la replicazione del virus nei macrofagi non è mai stata descritta (Truyen & Streck, 2019), dall'altro si è osservato che i virioni fagocitati rimangono comunque infettanti per un esteso periodo di tempo (Paul et al., 1979).

Una volta nel feto, il PPV1 incontra cellule con un elevato indice mitotico e può sfruttarne l'apparato di replicazione. Il virus è stato infatti individuato in molti tessuti e organi dei feti suini, suggerendo inoltre una mancanza di specificità in termini di tropismo tissutale (Wilhelm et al., 2005). È probabile che la morte fetale sia proprio il risultato del danno a tessuti e organi dovuto alle conseguenze della replicazione del PPV1, che induce l'apoptosi delle cellule infettate (Mengeling et al., 2000).

In riferimento ai diversi ceppi di PPV1 che sono stati individuati negli anni, alcuni autori hanno proposto la seguente classificazione sulla base della patogenicità e del tropismo tissutale:

- a) non patogeni (Cutlip & Mengeling, 1975);
- b) patogeni per i feti non immunocompetenti e responsabili di mortalità fetale (Paul & Mengeling, 1980);
- c) patogeni per i feti immunocompetenti e che inducono dermatite (Choi et al., 1987; Kresse et al., 1985);
- d) enterici (Dea et al., 1985).

1.4.6.1 Ruolo dei PPV in co-infezione con PCV-2 e PRRSV

Date le tipiche caratteristiche dell'allevamento intensivo, condizioni in cui gli animali siano simultaneamente infetti da più patogeni non sono poi così rare; spesso, infatti, il veterinario deve considerare una diagnosi differenziale dei possibili patogeni coinvolti. Nella patologia riproduttiva, un patogeno che da solo potrebbe non essere causa diretta di *reproductive failure*, potrebbe invece mostrare un comportamento sinergico con gli altri patogeni, mascherando il vero agente responsabile: in questi casi la vera "causa" del disordine riproduttivo è spesso la co-infezione.

La patogenicità di PPV1 è profondamente influenzata dalla presenza di altri virus (Truyen & Streck, 2019) e molti sono i casi in cui, anche i nuovi PPV, sono stati descritti in co-infezione con altri patogeni ben conosciuti, quali ad esempio il PCV-2. Questa specifica co-infezione è stata descritta sia nel suino domestico che nel cinghiale (Ouyang et al., 2019; Sliz et al., 2015).

Il PCV-2 è un patogeno diffuso a livello globale, coinvolto in una serie di sindromi denominate nel loro insieme come *porcine circovirus diseases* (PCVD), tra cui la PMWS (Segalés, 2012). Nei casi clinici di PMWS, il PCV-2 è spesso riscontrato in combinazione con più patogeni, virali o batterici che potrebbero complicare o confondere la presentazione clinica, e per i quali è stato descritto un effetto diretto che potenzierebbe la replicazione del PCV-2, sia in condizioni di campo che sperimentali (Opriessnig & Halbur, 2012). Nonostante tra i virus spicchino i PPV, è opportuno sottolineare che gli agenti co-infettanti sembrerebbero variare da paese a paese: ad esempio, in Corea del Sud, i più comuni agenti di co-infezione con PCV-2, sono proprio PRRSV e PPV (Kim et al., 2002), mentre in uno studio statunitense, tra 484 casi di PMWS analizzati, soltanto uno era positivo per PPV (Pallarés et al., 2002). Il fatto che i patogeni identificati in corso di PMWS siano molteplici, supporta l'ipotesi che vari tipi di co-infezione possano favorire la progressione dell'infezione sostenuta da PCV-2 verso la PMWS (Chae, 2004; Opriessnig & Halbur, 2012). Un'altra ipotesi potrebbe essere quella che vede il PCV-2 come causa di un'iniziale deplezione linfoide, a cui consegue un'aumentata suscettibilità ad altre infezioni virali e/o batteriche (Chianini et al., 2003; Darwich et al., 2003). Quanto è stato descritto per la co-infezione PPV/PCV-2 è esemplificativo della complessità del meccanismo patogenetico.

Il primo studio sperimentale in cui è stato dimostrato il potenziamento del PPV1 sul PCV-2 è stato condotto da Ellis et al. (1999), ottenendo la maggior parte delle lesioni tipiche della PCVD sistemica in suini gnotobiotici, inoculati con materiale prelevato da maiali naturalmente infetti. Entrambi i patogeni e i relativi anticorpi sono stati rilevati nei suini inoculati sperimentalmente (Ellis et al., 1999). Altri autori hanno poi dimostrato come i suini inoculati contemporaneamente con il PCV-2 e il PPV1 sviluppino una patologia e lesioni più gravi rispetto ai suini infettati esclusivamente con PCV-2 (Allan et al., 1999; Hasslung et al., 2005; Kennedy et al., 2000; Kim et al., 2003, 2006; Krakowka et al., 2000; T. Opriessnig et al., 2004; Ostanello et al., 2005). La presenza del PPV1 non è tuttavia un requisito necessario per lo sviluppo della PCVD (Ellis et al., 2004).

Sono stati proposti diversi meccanismi possibilmente responsabili di questa relazione sinergica: questi vanno dalla disfunzione immunitaria indotta da PPV1, al coinvolgimento delle stesse cellule e/o degli stessi fattori fisiologici ed elementi di micropatogenesi che complessivamente promuoverebbero la replicazione del PCV-2, o di entrambi gli agenti virali (Allan et al., 1999; Andersson et al., 2011; Choi et al., 2000; Choi & Chae, 1999, 2000; Kim et al., 2003, 2006; Kim & Chae, 2001; Kim et al., 2002; Kim & Chae, 2001; Krakowka et al., 2000; Opriessnig et al., 2017; Ouyang et al., 2019).

Per minimizzare gli effetti del PPV1 nel potenziare la replicazione del PCV-2 e nell'indurre la PMWS, potrebbe essere utile la vaccinazione per il PPV1 nei suini all'ingrasso in allevamenti in cui è frequente la co-infezione tra i due virus: anche se sperimentalmente non è stato possibile dimostrare l'efficacia di questo approccio (Opriessnig et al., 2004), in situazioni di campo è invece stato verificato con successo (Halbur, 2000, 2001). L'iper-immunizzazione dei riproduttori contro il PPV1 potrebbe essere utile a ridurre le perdite dei suinetti durante lo svezzamento, a causa della co-infezione con PCV-2 e PPV: è stata infatti descritta una correlazione diretta tra il titolo anticorpale del colostro delle scrofe e quello osservato in media nella loro nidiata (Damm et al., 2002; Opriessnig et al., 2004; Paul et al., 1982). La vaccinazione delle scrofe potrebbe, inoltre, risultare anche più pratica rispetto alla vaccinazione dei suini all'ingrasso (Opriessnig et al., 2004; Rodibaugh, 2002). Un altro elemento utile da tenere presente nel controllo di questi patogeni è che il PCV-2, come il PPV1, è fortemente resistente al calore, al congelamento, alla luce ultravioletta e ai disinfettanti chimici, imponendo rigorose misure di disinfezione e biosicurezza, che dovrebbero essere parte di qualsiasi programma di controllo per la PMWS (Krakowka et al., 2000).

Negli ultimi anni, a rendere questo rapporto tra il PCV-2 e i *Parvovirinae* ancora più interessante e complesso, hanno contribuito i nuovi PPV descritti, della cui co-infezione hanno parlato di versi autori: Novosel et al. (2018) e Opriessnig et al. (2014) hanno suggerito un'associazione tra il PCV-2 e il PPV2; Souza et al. (2016) e Li et al. (2013) con il PPV3, Cibulski et al. (2017) con il PPV4, Xing et al. (2018) e Wang et al. (2019) con il PPV7. Nonostante ciò, poche sono le informazioni riguardo al loro impatto e ai loro possibili effetti avversi sulla viremia e sull'infezione da PCV-2. Un esempio è stato descritto relativamente al PPV2, la cui viremia è stata osservata 2-3 settimane prima della comparsa di sintomi respiratori e dello sviluppo di segni clinici di PCVD (Opriessnig et al., 2013; Wang et al., 2010), e la cui prevalenza era significativamente maggiore in campioni polmonari provenienti da suini affetti

da PCVD, rispetto a suini sani (Opriessnig et al., 2014). Anche lo stesso PPV4 venne identificato per la prima volta in suini affetti da PCVD negli USA (Cheung et al., 2010), e una carica maggiore è stata descritta nel siero di suini con PMWS, rispetto a suini sani (Cibulski et al., 2017).

Una recente indagine condotta in Polonia, da Milek et al. (2020), ha contribuito a fornire nuove evidenze sulla presenza dei nuovi PPV (PPV1-7) in co-infezione con il PCV-2, a partire da campioni raccolti trasversalmente tra il 2014 e il 2017, da allevamenti “acute PCVD-free”, e affetti solo dalla forma subclinica. Secondo gli autori, è proprio la conoscenza di questo *background* clinico il punto forte del loro studio, in quanto un’analisi condotta su allevamenti in cui la PCVD acuta è ben controllata dai comuni programmi di vaccinazione contro il PCV-2, permetterebbe una migliore comprensione dell’interazione tra PPV1-7 e PCV-2, e del reciproco impatto sulla viremia, fornendo così informazioni aggiuntive sull’ecologia di questi virus in ambito allevatorio. Come previsto, anche in questo studio, le co-infezioni tra PCV-2 e almeno una specie di PPV si sono rilevate abbastanza comuni, essendo state descritte nel 21,6% del totale dei campioni e nel 70,4% dei campioni positivi per PCV-2. Nel complesso, tutte le specie, ad eccezione per il PPV4, sono state rilevate con una maggiore frequenza nei suini PCV-2-positivi che in quelli negativi. Un livello di viremia per PCV-2 significativamente più alto è stato però osservato soltanto in campioni positivi per PPV1 e PPV7: questi risultati suggeriscono quindi un possibile effetto di potenziamento del PPV1 e del PPV7 sulla replicazione del PCV-2 (Milek et al., 2020).

Nonostante la co-infezione dei PPV con il PCV-2 sia una condizione che comunemente si presenta in condizioni di campo e che sia ben noto il potenziale danno di questa relazione nella salute dei suini, secondo Opriessnig e Halbur (2012b), la magnitudine di questo fenomeno potrebbe essere addirittura sotto diagnosticata e più importante di quanto si creda. Questi autori suggeriscono che, una ricerca routinaria nei suini di accrescimento dei PPV, potrebbe fornire una visione più completa della situazione.

Per quanto concerne invece la co-infezione tra i PPV e PRRSV, il quadro complessivo appare meno chiaro, nonostante questi siano gli agenti che più spesso vengono rilevati, in caso di aborto in allevamenti affetti da *reproductive failure* (Mengeling et al., 2000; Rossow, 1998; Soares et al., 1999). Nonostante i disordini riproduttivi dovuti al PRRSV siano responsabili di perdite economiche annuali superiori a 300 milioni di dollari soltanto negli Stati Uniti

(Holtkamp, 2013), pochi sono infatti gli studi che si sono concentrati sulla forma riproduttiva della malattia, e sui meccanismi sottostanti (Lunney et al., 2016); ancora meno sono quelli che trattano la co-infezione tra il PRRSV e il PPV1.

È opportuno sottolineare come, questa mancanza di informazioni inerenti al *reproductive failure* causato da PRRSV e alla sua co-infezione con il PPV1, potrebbe essere legata anche alla presentazione clinica che differenzia questi due virus, la quale consente almeno di farsi un'idea iniziale nell'ottica di una diagnosi differenziale. Un elemento distintivo dell'aborto causato dal PPV1 è il gran numero di suinetti mummificati al momento del parto, o poco prima della data prevista. Nel caso di infezione durante i primi stadi della gestazione, la nidiata potrebbe essere meno numerosa a causa della morte embrionale o del riassorbimento, ma è comunque probabile che al momento del parto si rilevino dei feti mummificati, proprio per la diffusione tipica del virus a livello intrauterino, il quale tende ad infettare i membri della nidiata progressivamente, in stadi diversi della gestazione. Storicamente, i focolai di *reproductive failure* indotti dal PRRSV, si manifestano più spesso con aborto tardivo, suinetti nati morti e/o suinetti deboli e poco attivi, con alta mortalità pre-svezzamento (Lunney et al., 2016; Mengeling et al., 2000); dal 1997 hanno cominciato ad essere descritti anche ceppi più virulenti, caratterizzati da epidemie più gravi, acute, con aborti in qualsiasi momento della gravidanza, spesso accompagnati da rialzo termico e inappetenza, e in alcuni casi riluttanza al movimento, decubito e morte nelle scrofe (Zimmerman et al., 1997). L'altra differenza è che, mentre nelle categorie diverse dalle scrofe (Truyen & Streck, 2019) l'infezione da PPV1 non determina alcuna manifestazione clinica, i suini in accrescimento e all'ingrasso affetti da PRRSV manifestano invece un'importante sindrome respiratoria (Rossow, 1998).

Tolte queste caratteristiche distintive in ambito riproduttivo, sia per PPV1 che per PRRSV, la manifestazione clinica dipende anche dal momento della gestazione in cui avviene l'infezione: ne è un esempio la fase acuta dell'infezione, che spesso passa inosservata per entrambi i virus, in cui quello che si rileva è un eventuale aumento del tasso di ritorno in estro in allevamento, dovuto alla morte embrionale precoce (Lunney et al., 2016; Truyen & Streck, 2019). Se fosse presente la PRRS, la patologia respiratoria in allevamento non passerebbe invece inosservata. Ne consegue quindi che, per quanto il quadro clinico possa essere suggestivo per uno specifico patogeno, la complessità della patologia riproduttiva in termini di sinergismo fra più agenti richiede comunque l'utilizzo dei moderni metodi diagnostici che permettono una rapida identificazione del patogeno responsabile.

Nel caso in cui entrambi i virus siano ipoteticamente presenti in situazioni allevatorie in cui non si adottano le opportune misure di profilassi, è chiaro che il quadro richiederebbe un intervento correttivo più complesso e relativo non solo ad elementi manageriali, ma anche strutturali e formativi.

Date queste personali considerazioni, a fronte della mancanza di studi volti ad approfondire i meccanismi patogenetici alla base dei disordini riproduttivi causati dal PRRSV, è comunque opportuno ricordare il ruolo del PRRSV come patogeno immunomodulatore, e quindi come virus che potrebbe potenzialmente andare a modulare la risposta immunitaria nei confronti di altri agenti presenti in concomitanza, PPV1 compreso. Le analisi volte ad approfondire la risposta immunitaria contro il PRRSV *in vivo*, ad esempio in termini di risposta umorale e cellulare o di misurazione della produzione di citochine, sono state condotte principalmente nei sotto-scrofa e nei suinetti in accrescimento, sulla base di modelli respiratori della PRRS; gli studi relativi alle scrofe gravide sono, invece, abbastanza scarsi, e i tentativi di accorpare queste informazioni, mettono in evidenza la complessità dell'interazione virus-ospite, la quale non è ancora completamente chiarita (Lunney et al., 2016). Il ruolo del PRRSV in co-infezione con il PPV1 potrebbe anche essere imputabile al risentimento sistemico. Inoltre, nonostante PPV1 e PCV-2 condividano più elementi relativi alla patogenesi (es. dipendenza dalla fase S del ciclo della cellula ospite), quanto è stato sopra descritto sulla co-infezione tra questi due virus, potrebbe essere preso in considerazione anche per l'interazione PPV1-PRRSV, per la disfunzione immunitaria indotta dal PPV1, che potrebbe contribuire altrettanto alle conseguenze del PRRSV sulle performance riproduttive. In conclusione, molto rimane da comprendere sul ruolo che il PRRSV può avere in termini di effetti sulle performance riproduttive, e ancor di più sull'interazione tra questo e altri patogeni riproduttivi come il PPV1, anche in termini di meccanismi patogenetici.

1.4.7 Aspetti clinici e anatomopatologici

Il PPV1, considerato uno dei più importanti agenti di *reproductive failure* nel mondo (Mengeling et al., 2000), è, ad oggi, l'unico porcine parvovirus di cui è stata provata la patogenicità nel suino (Milek et al., 2020).

Nonostante l'ampia diffusione del PPV1, risulta difficile stimarne le perdite riproduttive, in quanto le conseguenze dell'infezione possono comparire anche settimane dopo, quando

l'allevatore si accorge di un aumento del tasso di ritorno in estro, e/o osserva le conseguenze cliniche del virus sulle nidiate. Inoltre, anche i test diagnostici sui tessuti fetali restituiscono spesso dei falsi negativi, probabilmente a causa dello loro avanzato stato di autolisi e degli alti titoli anticorpali delle scrofe che ne riducono la presenza virale (Truyen & Streck, 2019).

Il principale, se non l'unico segno clinico dell'infezione da PPV1 è il *reproductive failure* nelle scrofe, la cui natura varia in base alla loro copertura anticorpale: in gruppi vaccinati di scrofe, le perdite riproduttive sono in genere basse; al contrario, negli allevamenti in cui non viene praticata la vaccinazione, o nei quali non viene eseguita nella maniera corretta, il PPV1 può causare delle devastanti “*abortion storms*” (Truyen & Streck, 2019).

In condizioni sperimentali di infezione da PPV1, scrofette sieropositive e verri non presentano alcun segno clinico; i disordini riproduttivi si manifestano infatti solo nelle scrofette e nelle scrofe sieronegative (Mengeling & Cutlip, 1976; Mengeling & Paul, 1981; Thacker et al., 1987; Zeeuw et al., 2007). Nelle forme subcliniche, dopo circa 5-10 giorni dal momento dell'infezione, si può osservare una moderata e transiente linfopenia, indipendente dal sesso e dall'età dell'animale (Joo et al., 1976; Mengeling & Cutlip, 1976; Zeeuw et al., 2007).

Le conseguenze cliniche del PPV1 dipendono principalmente dal momento della gravidanza in cui si verifica l'infezione (Figura 7), oltre che dalla copertura anticorpale della scrofa. All'inizio della gestazione, l'embrione è ancora ricoperto dalla zona pellucida, che lo protegge dall'ingresso del virus fino al momento della schiusa, la quale avviene a circa 6 giorni dal concepimento. Da questo momento, fino a circa il 35° giorno di gestazione, l'infezione da PPV1 porta alla morte fetale, con conseguente riassorbimento materno dei tessuti fetali. Questo non è possibile dal 35° giorno in poi, momento in cui l'organogenesi è praticamente completa, e ha inizio l'ossificazione dello scheletro fetale. Per questo motivo, l'infezione dopo il 35° giorno sfocia, solitamente, nella morte fetale con conseguente mummificazione. Approssimativamente, dal 70° giorno in poi, il feto diventa immunologicamente competente, riuscendo così, in caso di infezione, a montare una risposta immunitaria, consentendogli potenzialmente di eliminare il virus. In quest'ultimo caso, l'infezione fetale sarebbe quindi subclinica, e i suinetti nati presenterebbero già degli anticorpi anti-PPV1 (Bachmann et al., 1975; Joo & Johnson, 1977; Lenghaus et al., 1978; Mengeling et al., 2000).

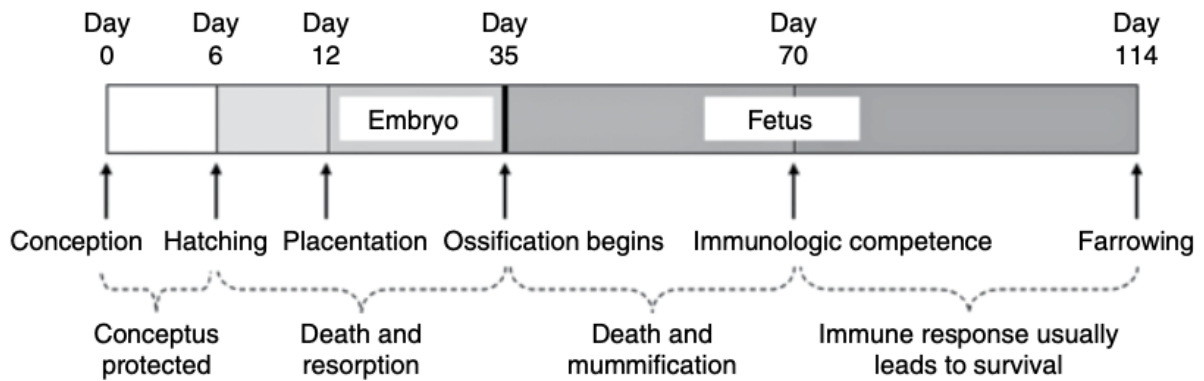


Figura 8: conseguenze dell'infezione da PPV1 a seconda della fase di gestazione (Mengeling et al., 2000; Truyen & Streck, 2019).

Per quanto riguarda le possibili lesioni, l'inoculazione sperimentale di PPV1 in verri, scrofette e scrofe non produce lesioni macroscopiche (Bachmann et al., 1975; Lenghaus et al., 1978; Mengeling & Cutlip, 1976; Thacker et al., 1987). Nei feti, invece, a seguito della morte fetale, il riassorbimento dei fluidi e dei tessuti molli, responsabili della mummificazione, è il rilevamento clinico più comune dell'infezione da PPV1. Occasionalmente, i vasi sanguigni superficiali diventano prominenti, a causa della congestione e della perdita di sangue nei tessuti connettivali; congestione, edema, emorragie con accumulo di fluidi siero-sanguinolenti nelle cavità corporee, e conseguente imbibizione tissutale, sono responsabili del progressivo inscurimento del feto, a cui segue la disidratazione fino alla completa mummificazione fetale. A seconda del momento in cui avvengono l'infezione, la morte fetale, e il conseguente arresto della crescita, i feti mummificati possono presentarsi con un grado variabile di sviluppo (Figura 8). Il processo di disidratazione può interessare ovviamente anche la placenta, che assume così un colore marrone-grigio e volume dei fluidi extra-fetali ridotto (Joo & Johnson, 1977; Lenghaus et al., 1978). Coerentemente con quanto detto in precedenza, dopo che i feti diventano immunocompetenti, non si osserva invece alcun cambiamento macroscopico post infezione (Bachmann et al., 1975).

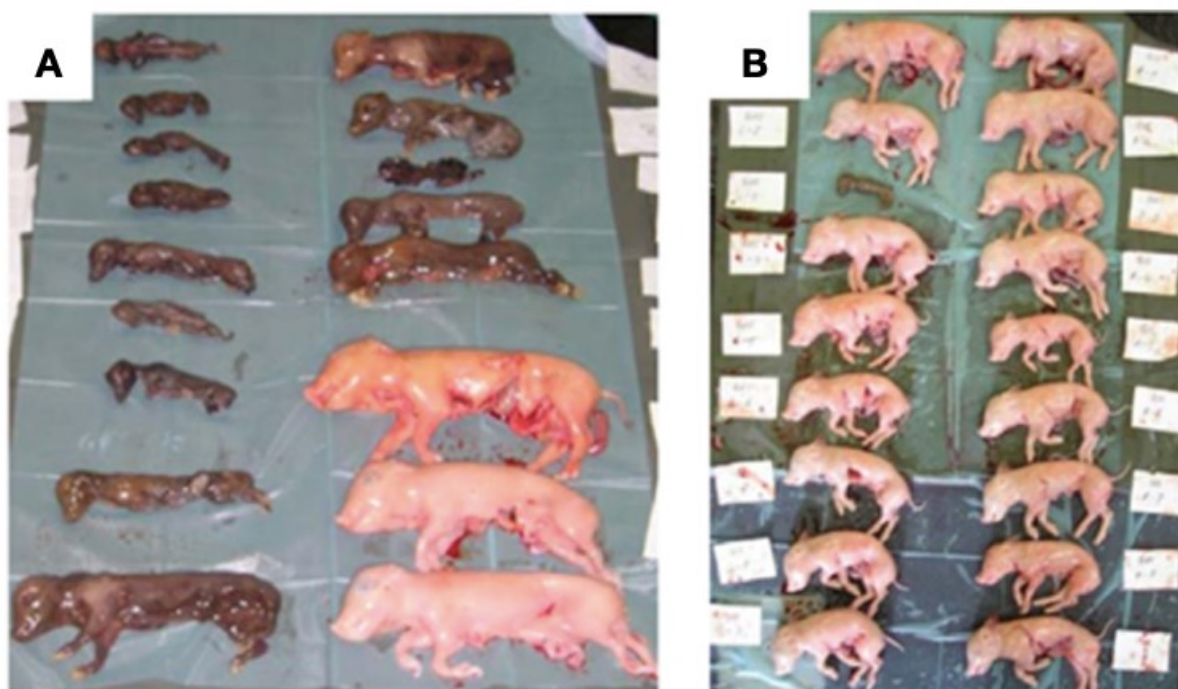


Figura 9: nidiata di scrofe gravide precedentemente inoculate con i ceppi 27a (A) e NADL-2 (B) al 90° giorno di gestazione. E' evidente la variabilità della gravità delle lesioni: la posizione dei feti corrisponde alla loro posizione nell'utero (quello più in alto era quello più vicino alla cervice) (Streck & Truyen, 2020; Zeeuw et al., 2007).

Oltre ai disordini riproduttivi, il PPV1 è stato associato anche a feci diarroiche nei suinetti, insieme ad altri ceppi minori *PPV1-like*, (Dea et al., 1985; Duhamel et al., 1991), anche se il ruolo patogenetico necessita ancora di essere stabilito.

Il PPV1 è stato identificato nei suinetti anche a livello di lesioni cutanee, in particolare erosioni a fessura (*slit-like erosions*) e simil-vescicolari a livello della cavità orale e del grugno (Kresse et al., 1985), o, in un'altra occasione, sotto forma di dermatite cronica ed essudativa (Whitaker et al., 1990). Tuttavia, si suppone che il PPV1 sia solamente un fattore predisponente per queste lesioni cutanee secondarie, non avendo osservato alcuna lesione in animali inoculati sperimentalmente per via cutanea (Lager & Mengeling, 1994).

Lesioni microscopiche con accumulo focale di cellule mononucleate adiacenti all'endometrio e negli strati più profondi della lamina propria in tessuti di scrofette gravide, sono state osservate dopo inoculazione transuterina dei feti; nel cervello, nel midollo spinale e nella corioide dell'occhio di questi ultimi è stato inoltre osservato un marcato *perivascular cuffing* di plasmacellule e linfociti (Hogg et al., 1977). Lesioni simili sono state osservate anche per inoculazioni eseguite in momenti precedenti della gestazione (a 35, 50 e 60 giorni); queste differivano soltanto per una gravità maggiore delle lesioni e per la presenza di un esteso

perivascular cuffing di cellule mononucleari attorno ai vasi miometriali ed endometriali (Lenghaus et al., 1978). Nell'utero di scrofette sieropositive, a seguito dell'inoculazione del virus nei feti, sono stati osservati soltanto degli accumuli focali di linfociti (Cutlip & Mengeling, 1975).

Nei verri, a seguito dell'inoculazione intra-testicolare sperimentale con PPV1, è stata descritta una degenerazione acuta dell'epitelio seminifero, con formazione e desquamazione di cellule multinucleate; dopo l'inoculazione intramuscolare, invece, non sono state osservate lesioni microscopiche (Thacker et al., 1987).

Nel feto, i cambiamenti istopatologici tendono invece ad essere più diffusi, e la necrosi delle cellule degli organi in via di sviluppo è la lesione microscopica principale (Joo & Johnson, 1977; Lenghaus et al., 1978). Quando il feto diventa immunocompetente, le lesioni microscopiche principalmente riscontrate sono l'infiltrazione di cellule mononucleari e l'ipertrofia endometriale (Hogg et al., 1977; Joo & Johnson, 1977). In feti infetti nati vivi ma partoriti con un certo ritardo rispetto alla data prevista, così come nei suinetti nati morti, sono state descritte anche delle meningoencefaliti, caratterizzate da *perivascular cuffing* con proliferazione di cellule avventizie, istiociti e dalla presenza di poche plasmacellule nella materia bianca e grigia del cervello e delle leptomeningi (Hogg et al., 1977; Joo & Johnson, 1977; Narita et al., 1975). Bolt et al. (1997) hanno identificato il PPV1 anche nel cuore di suinetti affetti da miocardite non suppurativa, caratterizzata da singoli foci di infiltrazione di cellule mononucleate, da lieve a moderata, e da emorragie tra i miocardiociti.

Per quanto riguarda le nuove specie di PPV, nonostante l'assenza di evidenze robuste di una loro potenziale patogenicità, la loro importanza per la salute del suino è stata comunque considerata in vari studi. I PPV4, 6 e 7, essendo stati identificati in campioni ottenuti da feti abortiti, sono tra le specie per cui più si sospetta un possibile ruolo come causa di *reproductive failure* (Cságola et al., 2012; Ni et al., 2014; Ouh et al., 2018); i PPV4 e 6 sono stati descritti anche in scrofe adulte che manifestavano disordini riproduttivi (Huang et al., 2010; Ni et al., 2014). Il PPV2, invece, è stato più volte individuato in campioni polmonari, in concomitanza di sintomi respiratori (Cságola et al., 2016; Novosel et al., 2018; Opriessnig et al., 2013; Wang et al., 2010).

1.4.8 Procedure diagnostiche

Ogni qualvolta si registri in allevamento un aumento del tasso di ritorno in estro, e/o si osservino dei ritardi nei parti, in associazione ad un aumento del numero di feti mummificati e di nidiata meno numerose, il PPV1 deve essere messo in diagnosi differenziale, soprattutto quando ad essere coinvolte sono scrofe primipare o alla seconda gravidanza. Sicuramente, la presenza in una stessa nidiata di suinetti normali e feti mummificati a diversi stadi di sviluppo, è la presentazione clinica più suggestiva di infezione da PPV1. Dato questo quadro clinico, in diagnosi differenziale con la parvovirosi, bisognerebbe includere, ad esempio, l'Aujeszky's disease, la brucellosi, la leptospirosi, la PRRS, la toxoplasmosi e le infezioni batteriche uterine non specifiche (Truyen & Streck, 2019). Nelle tipiche condizioni dell'allevamento intensivo, molte sono le malattie virali che possono infatti insorgere, motivo per cui è richiesta una rapida ed accurata diagnosi. Quest'ultima è essenziale per le campagne di sorveglianza e/o per i programmi di eradicazione, dato che la rapida identificazione degli animali infetti permette di ridurre la potenziale trasmissione del virus ai non infetti, contenendo così la propagazione della malattia (Giammarioli et al., 2008).

Tutte le matrici disponibili nel corso di problematiche riproduttive nella scrofa dovrebbero essere prese in considerazione per un approfondimento di laboratorio, così come l'esame del tratto urogenitale di scrofe riformate al macello. Nella diagnosi della patologia riproduttiva, gli esami di laboratorio includono l'identificazione o l'isolamento del patogeno, la titolazione degli anticorpi, l'istologia e le indagini chimiche delle tossine potenzialmente dannose per il tratto riproduttivo (Pozzi & Alborali, 2012). Nel caso del parvovirus, i campioni da conferire ai laboratori diagnostici dovrebbero includere sia feti mummificati che quel che rimane degli invogli. Il siero o i liquidi fetali, i suinetti nati morti o il siero raccolto dal cordone ombelicale prima dell'ingestione del colostro, possono essere testati per gli anticorpi specifici per il PPV. In alternativa ai feti, per documentare l'infezione da PPV1, è possibile utilizzare campioni di siero di scrofette e scrofe (Truyen & Streck, 2019).

Dopo la morte fetale, la possibilità di identificazione del PPV1 diminuisce progressivamente (Cutlip & Mengeling, 1975), in quanto dipendente soprattutto dalle condizioni dei tessuti fetali al momento della raccolta dei campioni; dai tessuti che sono già andati incontro ad autolisi è infatti difficile isolare il virus (Truyen & Streck, 2019). I metodi sinora citati sono però troppo laboriosi e poco efficienti per essere utilizzati nella diagnostica di routine. A questo scopo, la

polymerase chain reaction (PCR) è sicuramente la tecnica più utile ed efficace per l'identificazione del PPV1 nei tessuti fetali, nel seme e in altre matrici. Il vantaggio della PCR risiede infatti nell'alta sensibilità e specificità diagnostica, che consente l'identificazione del PPV1 anche nei tessuti andati incontro ad autolisi. In merito al PPV1, molti sono i protocolli che sono stati descritti (PCR based, quantitativePCR, e recombinase polymerase amplification) (Truyen & Streck, 2019), tra i quali sono inclusi anche dei protocolli multiplex, utilizzati soprattutto per l'individuazione del PPV1 in co-infezione con PCV-2 (Cao et al., 2005; Huang et al., 2004; Kim & Chae, 2003). Anche l'identificazione dei nuovi PPV2-7 si basa sostanzialmente sull'utilizzo della PCR (Kim et al., 2021; Miłek et al., 2019; Saekhow & Ikeda, 2015). Il loro isolamento in coltura cellulare è ancora difficile da realizzare, considerando anche la scarsa disponibilità degli anticorpi monoclonali e di altri reagenti virus-specifici.

Qualora i tessuti fetali non fossero disponibili, la sierologia può essere un utile strumento diagnostico. Poiché gli anticorpi materni non possono attraversare la barriera placentare, l'identificazione degli anticorpi nel siero o nei fluidi fetali, così come nei suinetti prima del consumo di colostro, sono indicativi di infezione uterina (Truyen & Streck, 2019). Nel caso di siero raccolto da scrofe e scrofette, l'interpretazione dei risultati può risultare complicata dalla vaccinazione, dall'alta prevalenza del PPV1 nella popolazione suina e dal tempo che intercorre tra il momento dell'infezione e il momento effettivo in cui si osservano le perdite riproduttive. Pertanto, la diagnosi a partire dal siero dovrebbe essere condotta su due campioni raccolti in due momenti distinti, in modo da riuscire ad apprezzare la variazione dei titoli anticorpali: al momento dell'insufficienza riproduttiva e un secondo campione a distanza di circa 2-4 settimane (Truyen & Streck, 2019).

Tra i test sierologici, il test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) veniva comunemente utilizzato per l'identificazione e la quantificazione degli anticorpi sierici PPV1-specifici, ma un'alternativa preferibile, e attualmente più utilizzata, è la metodica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), vista la possibilità di standardizzazione e di automatizzazione. Un altro vantaggio importante offerto da questo metodo diagnostico è la possibilità di distinguere gli animali vaccinati da quelli infetti: i vaccini inattivati portano alla formazione solo di anticorpi contro le proteine strutturali (VP1/VP2), mentre nei suini infetti è possibile rilevare anche quelli contro le proteine non strutturali, espresse durante la replicazione del virus (Madsen et al., 1997; Qing et al., 2006). Attualmente non sono disponibili dei test per la rilevazione degli anticorpi contro PPV2-7, sebbene siano in corso studi dedicati (Cságola et al., 2016).

Seppur non si tratti di una procedura diagnostica standard, l'isolamento virale è considerato uno strumento utile per la crescita, la propagazione e la titolazione del virus. A tale scopo, vengono tipicamente utilizzate delle colture cellulari continue (ESK, PK-15, SK6, ST, STE e SPEV), avendo un minor rischio di contaminazione e un maggiore indice di divisione rispetto a quelle primarie (Mengeling, 1972; Zimmermann et al., 2006). Questo è uno strumento molto utile anche in virtù dei nuovi ceppi di PPV1, per studiarne l'eventuale patogenicità. Nessuna delle nuove specie di PPV è mai stata isolata in colture cellulari (Truyen & Streck, 2019). Inclusioni nucleari, picnosi del nucleo, granulazioni, forma irregolare, replicazione lenta e successiva morte cellulare, sono alcuni degli effetti citopatici del PPV1 che si possono osservare nelle colture cellulari (Cartwright et al., 1969; Mengeling, 1972).

Per la ricerca dell'antigene virale nei tessuti fetali (Cutlip & Mengeling, 1975; Mengeling, 1978), o per confermare l'infezione da PPV1 nelle colture cellulari, e titolare poi il virus, una procedura affidabile è l'immunofluorescenza (R. H. Johnson, 1973; Mengeling, 1978). In alternativa, poiché il PPV1 produce un'emoagglutinina virale, esso può anche essere titolato sfruttando la sua attività emoagglutinante nei confronti degli eritrociti (Joo & Donaldson-Wood, 1976; Siegl, 1976).

1.4.9 Immunità, prevenzione e controllo del virus

I suinetti nati da scrofe sieropositive sono protetti dagli anticorpi materni acquisiti tramite il colostro consumato il primo giorno di vita; gli anticorpi contro il PPV1 sono 10 volte più concentrati nel colostro che nel siero. Nella maggior parte dei suini, i livelli di anticorpi materni diminuiscono costantemente, fino a raggiungere titoli non rilevabili dopo circa 20 settimane di età. Tuttavia, in alcuni casi, questi potrebbero persistere fino a 9 mesi e interferire così con la capacità delle giovani scrofette di rispondere alla vaccinazione (Truyen & Streck, 2019).

Nelle infezioni di campo, o in caso di vaccinazione, l'immunità attiva contro il PPV1 si sviluppa entro pochi giorni. I test di neutralizzazione del virus o di HI permettono di rilevare gli anticorpi già a 6 giorni dall'infezione, con una marcata differenza tra il titolo anticorpale indotto dai vaccini inattivati in commercio e dall'infezione da virus di campo: con l'HI, ad esempio, i titoli anticorpali del vaccino sono solitamente ≤ 500 , mentre, a seguito dell'infezione, i titoli anticorpali superano regolarmente 2000 (Truyen & Streck, 2019). La persistenza degli anticorpi contro il PPV1 sembrerebbe avere una variabilità da 4 mesi a 4 anni (Johnson et al., 1976; Joo & Johnson, 1977). È stata inoltre descritta anche l'immunità cellulare ed è stata dimostrata la

proliferazione di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ virus-specifiche, dopo il contatto con l'antigene PPV (Ladekjær-Mikkelsen & Nielsen, 2002). Non sono disponibili dati riguardo l'immunità e/o le risposte immunitarie nei confronti di PPV2-7 (Truyen & Streck, 2019).

Non esiste alcun trattamento specifico per la parvovirosi, e le buone pratiche generali di gestione dell'allevamento, inclusa la biosicurezza, sono essenziali per il mantenimento di un ottimale stato di salute complessivo nella popolazione animale (Pozzi & Alborali, 2012). Come anticipato nei capitoli precedenti, l'ampia diffusione nella popolazione suina e l'alta resistenza ambientale, complicano il controllo del virus.

L'obiettivo che deve essere perseguito in ogni allevamento, per poter controllare la malattia causata da PPV1, è il mantenimento della relativa immunità all'interno della popolazione suina. Per quanto riguarda la copertura immunitaria, diversi sono gli approcci storicamente utilizzati dagli allevatori di suini per infettare le scrofette con PPV1 prima della gestazione: ne è un esempio l'infezione naturale mediante esposizione a tessuti contaminati da virus provenienti da nidi colpite. Per quanto possano essere efficaci, approcci di questo tipo sono sia inaffidabili che pericolosi perché possono provocare la diffusione di altri agenti patogeni nella popolazione, come ad esempio il virus della peste suina classica. La vaccinazione regolare delle femmine riproduttrici contro il PPV1 è, senza alcun dubbio, preferibile e più affidabile (Truyen & Streck, 2019). Nel caso in cui un gruppo di scrofe sia sufficientemente immunizzato, successivamente alla vaccinazione o all'esposizione naturale al virus, l'eventuale introduzione di PPV1 nel gruppo non determinerà l'insorgenza immediata dei relativi segni clinici. Tuttavia, i vaccini attualmente utilizzati inducono titoli anticorpali sufficienti a prevenire la malattia, ma non l'infezione, consentendo inoltre la replicazione, la trasmissione e quindi la circolazione del virus in allevamento (Foerster et al., 2016; Jóźwik et al., 2009). Nonostante questi aspetti, e un possibile coinvolgimento dei vaccini nella determinazione di nuovi ceppi/specie virali (Read & Mackinnon, 2010), è doveroso sottolineare come la profilassi vaccinale rappresenti il migliore strumento per prevenire perdite riproduttive devastanti, legate alle cosiddette "*abortion storms*" che virus come il PPV1 sono in grado di determinare nei gruppi di scrofe non vaccinate, o in cui la vaccinazione non è stata gestita in maniera corretta (Zimmerman et al., 2019). In tutto questo non bisogna dimenticare la minaccia rappresentata dalle nuove varianti antigeniche di PPV1 e dalle nuove specie, contro le quali, al momento, non sono disponibili vaccini commerciali (Streck & Truyen, 2020).

I primi vaccini sviluppati negli anni '70 si basavano principalmente sull'inattivazione del virus (Joo & Johnson, 1977; Mengeling et al., 1979; Suzuki & Fujisaki, 1976). Pochi anni dopo, la vaccinazione regolare delle scrofe con questi vaccini divenne una pratica comune a livello globale. Anche la maggior parte dei vaccini commerciali attualmente utilizzati contro il PPV1 si basano su virus derivati da colture cellulari (solitamente sui ceppi non patogeni NADL-2 e IDT), inattivati chimicamente e adiuvati; vengono comunemente somministrati per via parenterale. In studi sperimentali, è stata descritta una durata variabile di 4-13 mesi degli anticorpi stimolati dai vaccini inattivati (Joo & Johnson, 1977; Vannier et al., 1986). La rivaccinazione regolare delle scrofe riproduttrici appare quindi necessaria per mantenere l'immunità protettiva nelle scrofe: nelle scrofette viene generalmente somministrata la prima dose a 170-180 giorni di età, o 30 giorni prima dell'inseminazione; 15 giorni dopo viene somministrata la seconda dose. Le scrofe ricevono solitamente un *boost* 10-15 giorni dopo ogni parto, mentre i verri possono essere vaccinati annualmente (Streck & Truyen, 2020).

Oltre ai vaccini inattivati, sono stati sviluppati anche vaccini con virus vivi modificati (MLV) contro il PPV1, il cui utilizzo è ancora dibattuto. La maggior parte di questi vaccini si basa sempre sul ceppo non patogeno NADL-2 e la somministrazione per via parenterale sembra avere un'efficacia maggiore rispetto a quella per via orale. La vaccinazione con MLV induce una risposta immunitaria di lunga durata, con viremia e diffusione del virus vaccinale per un breve periodo di tempo dopo la vaccinazione. La quantità di virus somministrata sembra, inoltre, essere correlata sia alla successiva eliminazione del virus, che ai titoli anticorpali (Paul & Mengeling, 1980, 1984). Tuttavia, nonostante il vaccino con MLV risulti efficace nel prevenire la malattia riproduttiva, l'inoculazione diretta del vaccino in utero sembrerebbe avere un effetto patogeno sui feti, suggerendone così l'utilizzo limitato agli animali non gravidi (Paul & Mengeling, 1980). Per questo motivo, nei suini, i vaccini attualmente utilizzati sono ancora quelli inattivati. Nei carnivori invece, i vaccini inattivati sono stati sostituiti da quelli modificati, avendo dimostrato un'ottima efficacia e una lunga durata della risposta immunitaria (Day et al., 2016; Decaro et al., 2020; Ford et al., 2017). I pochi vaccini inattivati autorizzati rimasti vengono utilizzati per specifici scopi, quali ad esempio la vaccinazione dei grandi felini esotici (Truyen & Streck, 2019) o di animali gravidi ad alto rischio.

Nei suini, una protezione comparabile a quella dei vaccini inattivati viene fornita anche dai diversi vaccini a subunità descritti per PPV1, la maggior parte dei quali si basa sull'espressione della proteina virale VP2 in baculovirus (Antonis et al., 2006).

I vaccini inattivati attualmente utilizzati risultano essere efficaci nel prevenire l'insorgenza dei disordini riproduttivi (Foerster et al., 2016; Jóźwik et al., 2009). Tuttavia, è necessario evidenziare come i sieri degli animali vaccinati abbiano registrato un'alta attività di neutralizzazione contro i virus omologhi, ma bassa contro il ceppo 27a, mettendo così in dubbio l'efficacia dei vaccini attualmente utilizzati contro il PPV1 (Zeeuw et al., 2007). L'attività neutralizzante degli anticorpi svolge infatti un ruolo fondamentale nella protezione contro lo sviluppo della patologia, e la bassa attività nei confronti del PPV-27a, ceppo rappresentativo di un nuovo cluster di virus *27a-like*, è indicativo della necessità di una rivalutazione dell'attuale strategia di vaccinazione contro l'infezione da PPV1. Interessante è lo studio condotto recentemente da Kiss et al. (2020), in cui hanno confrontato l'efficacia di un vaccino contenente un ceppo Kresse-like (K22) inattivato, con quella dei vaccini attualmente utilizzati, implementati sul NADL-2: la protezione contro il PPV-27a, fornita dal primo, è risultata maggiore rispetto a quella garantita dal vaccino commerciale. L'esatto meccanismo con cui il vaccino *K22-based* sia in grado di offrire una maggiore protezione rimane ancora da chiarire, anche per quanto riguarda il possibile contributo di altre componenti del vaccino, diverse da quello comune (es. metodo di produzione, adiuvanti).

Una prospettiva interessante per lo sviluppo di nuovi vaccini è quella offerta dalle nuove tecniche di inattivazione virale, come l'*high hydrostatic pressure* (HHP). Questa metodica permette, infatti, di mantenere intatti i siti immunologici chiave, migliorando così l'utilità del virus inattivato per lo sviluppo del vaccino, senza introdurre nuove sostanze chimiche nel processo di produzione, e quindi negli animali destinatari del vaccino (Demazeau & Rivalain, 2011; Shearer & Kniel, 2009; Silva et al., 2014, 2015). Questa tecnica di inattivazione virale, combinata ai modelli di *epitope mapping*, che fornirebbero una più ampia e dettagliata prospettiva degli epitopi chiave delle proteine capsidiche VP1/VP2, potrebbe rappresentare una nuova frontiera per lo sviluppo di nuovi vaccini anche contro i nuovi parvovirus (De Souza et al., 2019). Degni di attenzione non sono infatti soltanto i nuovi ceppi di PPV1, ma anche le nuove specie PPV2-7, che evidenziano ulteriormente l'esigenza sia di un approfondimento della loro rilevanza clinica, che dell'implementazione di nuovi vaccini che siano in grado di indurre un'immunità più duratura e di fornire alti titoli anticorpali neutralizzanti (Jóźwik et al., 2009; Truyen & Streck, 2019). L'aggiornamento continuo dal punto di vista epidemiologico, insieme alle nuove tecniche diagnostiche, di prevenzione e di controllo, appaiono fondamentali per proteggere la popolazione suina dalla minaccia dei nuovi parvovirus circolanti.

2 SCOPO DELLA TESI

Alla luce delle evidenze epidemiologiche relative alle nuove specie di PPV riscontrate in altri paesi europei, risulta difficile immaginare in Italia un quadro epidemiologico che sia rimasto immutato negli anni, considerando soprattutto la peculiarità della nostra zootecnia, altamente concentrata a livello territoriale ed interconnessa. Con l'obiettivo di colmare la mancanza di informazioni sull'epidemiologia di PPV1 e delle nuove specie di parvovirus suino, questo studio intende fornire un aggiornamento epidemiologico relativamente alla loro presenza nel territorio italiano, valutandone la prevalenza in feti prelevati da focolai di *reproductive failure* e conferiti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER). Lo studio si è avvalso di una metodica diagnostica quantitativa per la rilevazione simultanea di più specie virali di parvovirus, precedentemente pubblicata. La consapevolezza del reale contesto epidemiologico relativo alle nuove specie di PPV porrebbe le basi per approfondimenti ulteriori anche in categorie produttive diverse dalla scrofa, nell'ottica di comprenderne la prevalenza in allevamento, l'ecologia, i fattori di rischio, nonché la loro potenziale rilevanza clinica per altre performance produttive o sindromi cliniche, anche in relazione ad altri agenti patogeni e/o contesti aziendali.

3 MATERIALI & METODI

3.1 Campioni

Il presente studio è stato condotto su campioni di feto suini conferiti presso l'IZSLER nel biennio 2019- 2020, provenienti da aziende con focolai di *reproductive failure* in corso, situate nel Nord Italia, nell'ambito di attività diagnostica di routine. Presso l'Istituto è stato assegnato un numero identificativo progressivo, chiamato "numero Darwin" in riferimento al database utilizzato. I feto conferiti dalla stessa azienda ma provenienti da scrofe diverse, sono stati identificati con lo stesso numero Darwin, seguito da una barra e il numero progressivo della scrofa. Gli organi di interesse (fegato, polmone, cuore e placenta) sono stati prelevati da ogni feto e omogenati in pool di almeno tre feto, tranne per i feto abortiti nelle prime fasi della gestazione che sono stati processati per intero.

Gli omogenati sono stati consegnati agli specifici laboratori dell'Istituto per le analisi batteriologiche e molecolari preliminari, mentre un'aliquota per ogni scrofa è stata conservata in congelatore a -20°C per essere conferita al Laboratorio di Malattie infettive del Dipartimento MAPS. Le analisi preliminari svolte presso l'Istituto sono state eseguite secondo un protocollo standardizzato che include analisi batteriologiche per *Escherichia coli* e *Streptococcus suis*, e molecolari per PRRSV, PCV-2, PPV1, *Leptospira interrogans* e *Chlamydia spp.* I primer e le sonde per lo screening per PPV1 in uso presso l'IZSLER sono gli stessi utilizzati in questo studio.

3.2 Database

Insieme alle aliquote dei campioni, l'IZSLER ha condiviso un database in Microsoft Excel® riportante l'ID unico, il numero Darwin, l'anno e la data di conferimento, il numero di feto, la provincia in cui è situata l'azienda e i risultati qualitativi ottenuti dalle analisi batteriologiche e molecolari preliminari. Lo stesso database è stato poi ampliato con i dati ottenuti da questo studio, ovvero inputando i risultati quali-quantitativi delle indagini biomolecolari per la ricerca di PPV.

3.3 Estrazione degli acidi nucleici

Dai campioni sono stati estratti gli acidi nucleici con il kit Viral DNA/RNA (A&A Biotechnology) con estrazione su colonnine con membrane di silice, secondo le istruzioni della casa produttrice. Durante la fase di estrazione, ad ogni campione è stata aggiunta un'aliquota

di controllo interno di reazione, presente nel kit QuantiFast Pathogen PCR+IC Kit (QIAGEN), in modo da valutare l'avvenuta estrazione e ridurre il rischio di falsi negativi dovuti ad errori nella preprocessazione dei campioni. Lo stock di campione e gli acidi nucleici estratti sono stati conservati a -80°C fino a successive analisi.

3.4 Disegno e produzione del plasmide

In assenza di campioni a positività nota per le nuove specie di PPV, è stato disegnato un plasmide contenente le sequenze dei patogeni di interesse, nelle regioni target delle metodiche di real-time PCR scelte per lo studio.

Per il disegno del plasmide, sono state scaricate da Genbank le sequenze di riferimento delle specie note di PPV (PPV1 Acc. Num. KF913351.1; PPV2 Acc. Num. GU938299; PPV3 Acc. Num. JF738367; PPV4 Acc. Num. GQ387500; PPV5 Acc. Num. JX896321; PPV6 Acc. Num. KR709268; PPV7 Acc. Num. KU563733). Ogni sequenza è stata allineata in MEGA X (Kumar et al., 2018) ai rispettivi primer utilizzati nelle metodiche di real-time PCR e la regione compresa tra i primer (con 10 nucleotidi di margine precedenti e successivi ai primer *forward* e *reverse*, rispettivamente) è stata riportata su un file FASTA. I segmenti di genoma delle varie specie di PPV contenenti le regioni target sono stati concatenati in un'unica sequenza in un altro file FASTA, inviato alla ditta Genscript Biotech (Paesi Bassi) per la sintesi del plasmide.

3.5 Metodiche duplex real-time PCR

La ricerca delle diverse specie di PPV è stata effettuata mediante quattro distinte duplex real-time PCR. La ricerca di PPV1 e PPV2, PPV3 e PPV6, PPV4 e PPV5 è stata svolta mediante tre *duplex* real-time PCR descritte da Milek et al., (2019), utilizzando gli stessi primer, sonde e combinazioni di patogeni. La ricerca di PPV7 è stata eseguita secondo la metodica descritta da Palinski et al. (2016), e messa a punto in *duplex*, insieme al saggio per la valutazione del controllo interno compreso nel kit di real-time PCR, per una contemporanea verifica dell'estrazione avvenuta.

Sonde e primer utilizzati sono riportati in tabella 2 e, per ogni specie sono stati impiegati sonde e primer dedicati, ad eccezione della metodica per l'individuazione di PPV4 e PPV5, che prevedeva la stessa coppia di primer e due sonde differenti.

Per l'esecuzione delle reazioni sono stati utilizzati il kit QuantiFast Pathogen PCR+IC Kit (QIAGEN) e il termociclatore LightCycler® 96 Instrument (Roche).

Ogni reazione di amplificazione è stata eseguita su un volume totale di 10 μ L contenente per ciascun campione:

- 2 μ L di 5x QuantiFast Pathogen Master Mix,
- 0.4 μ M di ciascun primer,
- 0.1 μ M di ciascuna sonda,
- 1 μ L di Internal Control Assay (aggiunto solo nella metodica duplex per la ricerca di PPV7 e la valutazione della presenza del controllo interno),
- 2 μ L di campione estratto,
- acqua ultrapura da biologia molecolare fino ad un volume di 10 μ L.

Il profilo termico utilizzato per l'amplificazione ha previsto per tutte le metodiche una fase di attivazione iniziale a 95°C per 5 minuti e 45 cicli caratterizzati da una fase di denaturazione a 95°C per 15 secondi e una di *annealing* ed *extension* a 60°C per 30 secondi.

La messa a punto dei protocolli di real time PCR è stata effettuata a partire da diluizioni seriali in base 10 del plasmide contenente le sequenze di interesse che, hanno permesso di ottenere le curve standard essenziali per la quantificazione.

A partire da una lunghezza del plasmide di 4096 nucleotidi e una massa molare di 650 g/mol/bp, è stata calcolata una massa molare di 2662400 g/mol per un totale di 226186899 copie/ng di plasmide. La concentrazione iniziale ha permesso di calcolare il volume di diluizione necessario a raggiungere la concentrazione 10^8 copie/ μ L di partenza per le successive diluizioni seriali, utilizzate per la validazione della metodica.

I valori di efficienza e il *limit of detection* (LOD) delle varie metodiche sono risultati per PPV1 1.97×10^0 copie/ μ L; PPV2 2.04×10^1 copie/ μ L; PPV3 1.82×10^1 copie/ μ L; PPV6 1.87×10^0 copie/ μ L; PPV4 1.76×10^1 copie/ μ L; PPV5 1.79×10^1 copie/ μ L; PPV7 1.83×10^1 copie/ μ L.

Tabella 2: primer e sonde utilizzate per PPV1-7 e relative referenze.

Primers/probes	Sequence (5'-3')	References
PPV1F	CAGAATCAGCAACCTCACCA	Opriessnig et al., 2011
PPV1R	GCTGCTGGTGTGTATGGAAG	
PPV1-Probe	FAM-5'-TGCAAGCTTAATGGTCGCACTAGACA-3'-BHQ	
PPV2F	TACTGAGCCCTAAGACTGACTACAAGC	Xiao et al., 2013
PPV2R	GTTTGTCTCGTTGTTCTGATG	
PPV2-Probe	HEX-5'-AACTGCTACATGAACCACCTTACCCSTC-3'-BHQ	
PPV3F	CAYGAYGAACGGTACGATGAAAT	Xiao et al., 2012
PPV3R	GCGGTAAAACCTGTGAWAWTTGAAC	
PPV3-Probe	HEX-5'-TAGGTTGATGAATAAGGAGATAGAGAGGGCGG-3'-BHQ	
PPV4/5F	GCATTGGTGTGTGTCTGTGTCC*	Xiao et al., 2013
PPV4/5R	GTGGCACATTTGTACATGGGAG*	
PPV4/5-Probe	FAM-5'-CTCCGCGGGATGTGCTTACAATTTCA-3'-BHQ	
PPV6F	GGCTTCATAATCCCTCCAAAACCT	Cui et al., 2017
PPV6R	GCTCATCTTCCTCTTGTTCCTG	
PPV6-Probe	FAM-5'-CCTCCTCCTCCTCCCTCTCCAATTCCT-3'-BHQ	
PPV7F	AGC AGA GAC AAA CAC AGA CG	Palinski et al, 2016
PPV7R	CCA GTT TGC ATT GTT CCC ATC	
PPV7-Probe	5'-FAM- CAG GCA GTG GTA GTG AAG GAT CCC- Iowa Black-3'	

3.6 Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati ottenuti è stata eseguita tramite Microsoft Excel[®]. La positività per una specie di PPV è stata quantificata fino al raggiungimento del LOD della rispettiva metodica, mentre valori inferiori al LOD sono stati comunque considerati ma registrati come <1 copia/μL. Le aziende di provenienza dei campioni sono state divise a seconda dell'anno in cui è avvenuto il conferimento. Le positività rilevate per le singole aliquote sono state poi raggruppate per azienda. Sono state quindi analizzate le frequenze di positività ai PPV in funzione di anno di campionamento, positività agli altri patogeni del pacchetto diagnostico per *reproductive failure*, azienda. La sintesi di queste analisi è stata riportata tramite tabelle e grafici, riassuntivi delle frequenze assolute e relative.

La positività al batteriologico racchiude la diagnosi sia per *S.suis* che per *E.coli*, per rendere più robusta l'analisi dei dati, indipendentemente dalla specie batterica.

4 RISULTATI e DISCUSSIONE

I campioni oggetto delle analisi provenivano da 80 aziende, di cui 45 campionate nel 2019 e 54 nel 2020. Diciannove aziende (24,4%) hanno conferito campioni in entrambi gli anni di monitoraggio.

Complessivamente, sono stati conferiti 562 feti analizzati in 163 aliquote, ognuna corrispondente ad una scrofa.

I risultati che verranno qui presentati tratteranno in un primo momento le prevalenze relative alle diverse specie di PPV, sia complessivamente per le 80 aziende che più in particolare per le 19 aziende per le quali è disponibile un dato epidemiologico sia per il 2019 che per il 2020. In un secondo momento verranno analizzate le positività dei PPV in relazione alle co-infezioni con gli altri patogeni ricercati nelle analisi preliminari condotte presso l'IZSLER.

4.1 PPV: prevalenze e co-infezioni

Nell'ottica di un aggiornamento epidemiologico del PPV1 e di una prima ricerca dei PPV2-7, in tabella 3 sono riportate le varie prevalenze in riferimento alle aziende campionate per anno.

Tabella 3: prevalenze dei PPV sul totale delle aziende campionate per anno: 45 aziende nel 2019; 54 aziende nel 2020. Le aziende campionate entrambi gli anni sono 19.

**Uniche specie di PPV presenti nella stessa azienda nel biennio 2019-2020.*

Anno	Prevalenze patogeno (conteggio e frequenza relativa)						
	PPV1*	PPV2	PPV3	PPV4	PPV5	PPV6	PPV7*
2019	3 (6,7%)	2 (4,4%)	8 (17,8%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)	9 (20,0%)	6 (13,3%)
2020	17 (31,5%)	0 (0%)	9 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (22,2%)	6 (11,1%)
Totale	20 (25,0%)	2 (2,5%)	17 (21,3%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	21 (26,3%)	12 (15%)

Il primo dato epidemiologico importante, in quanto scopo primario di questo studio, è l'identificazione di tutti i nuovi PPV2-7 in almeno un'azienda tra quelle testate nel 2019, con una variabilità che va da 1 azienda per i PPV4-5 a 9 aziende per il PPV6. Ciò rappresenta una prima evidenza della loro circolazione nel territorio italiano e di una prima identificazione in casi di *reproductive failure* per PPV2-3-5, mentre i PPV4-6-7 già in passato sono stati rilevati in feti abortiti, anche se non in Italia (Cságola et al., 2012; Ni et al., 2014; Ouh et al., 2018).

Sia nel 2019 che nel 2020, le specie maggiormente identificate sono in ordine PPV6-1-3-7. Questo rappresenta una differenza rispetto ai risultati di Milek et al. (2019), ottenuti in Polonia

in riferimento alle specie PPV1-6, dove PPV2 mostra più alte prevalenze in diverse categorie di suini. Per quanto possa stupire la bassa prevalenza di PPV2 riscontrata in questo studio, è necessario sottolineare che i tessuti fetali potrebbero non rappresentare la matrice ideale per la rilevazione del patogeno, in quanto fortemente influenzata dal grado di autolisi a cui sono soggetti i feti, come dimostrato per il PPV1. Nello studio condotto da Milek et al. (2019), le matrici analizzate comprendevano infatti fluidi orali, feci e siero di sotto-scrofa, suinetti in svezzamento e suini all'ingrasso: i fluidi orali sembrerebbero essere la matrice con il più alto tasso di rivelamento per quasi tutti i PPV; solo il PPV2 parrebbe essere più facilmente identificabile nel siero, seppur di poco (48,7% vs 53,9%). La carente capacità di rilevamento del PPV2 nei feti abortiti è stata descritta anche in un altro studio (Cságola et al., 2012), confermando i dubbi sull'idoneità della matrice diagnostica analizzata.

Da questo punto di vista, è la scarsa presenza di PPV4 e PPV5 a stupire, in quanto i feti abortiti si sono rivelati la matrice migliore per PPV4, secondo quanto descritto da Cságola et al. (2012). A tal proposito, l'utilizzo della stessa coppia di primer per la ricerca in *duplex* real-time PCR per PPV4-5, potrebbe rappresentare un potenziale punto critico da risolvere, con la futura messa a punto di metodiche distinte e più performanti per un'eventuale rivalutazione dei campioni.

Un secondo dato epidemiologico rilevante, e non meno importante, è quanto emerge dalle prevalenze riscontrate per PPV1 nel 2019 (6,7%) e nel 2020 (31,5%), per un totale di positività pari al 25% delle aziende testate, a cui solo un'azienda contribuisce in entrambi gli anni. Questo dato non soltanto rappresenta un aggiornamento dell'epidemiologia in Italia dell'unico parvovirus la cui rilevanza clinica è stata accertata, ma anche un'evidenza della sua circolazione nonostante la vaccinazione ampiamente diffusa. È opportuno però ricordare che il vaccino utilizzato previene soltanto l'insorgenza della malattia, ma non impedisce l'infezione e la trasmissione virale, per cui l'identificazione e circolazione del PPV1 non deve meravigliare. Curioso è però il fatto che, sia nel 2019, che nel 2020, alcune aziende sono state trovate positive esclusivamente per il PPV1. Le possibili implicazioni verranno analizzate nel prossimo capitolo.

Il PPV1 è anche la specie che è stata rilevata a concentrazioni più elevate, con alcuni campioni che hanno registrato dei titoli molto elevati, attorno a 10^7 - 10^8 copie/ μ L, in co-infezione rispettivamente con *Chlamydia spp.* e con PCV-3. D'altro canto, l'unica azienda risultata positiva a PPV1 nelle analisi di routine condotte presso l'IZSLER non rientra fra quelle positive

a questo patogeno in questo studio; essa è infatti risultata positiva per PPV7. Le discrepanze nella diagnosi di PPV1, soprattutto in virtù delle alte concentrazioni a cui questo è stato rilevato, sottolineano la necessità di un confronto tra le metodiche e i protocolli adottati e di un aggiornamento degli approcci diagnostici in virtù delle nuove evidenze.

Le prevalenze nelle aziende testate nel 2019 e nel 2020, risultate positive per almeno una specie di PPV, sono rispettivamente pari al 46,7% (21/45) e al 57,4% (31/54). Fra queste, il 23,8% (5/21) e il 29,0% (9/31) sono risultate positive per più di una specie di PPV, rispettivamente nel 2019 e nel 2020. Nello specifico, nel 2019, degli allevamenti positivi a più di una specie (n=5), 1 (20%) è risultato positivo per 2 specie, 4 (80%) per 3 specie (in diverse combinazioni). Con riferimento alle aziende positive a più specie nel 2020 (n=9), 6 (66,7%) sono quelle positive a 2 specie, 2 (22,2%) a tre specie e 1 (11,1%) a quattro. I parvovirus riscontrati più spesso in co-infezione sono il PPV3 e il PPV6, sia nel 2019 che nel 2020, rappresentando così il 50% del totale delle aziende in cui era presente una co-infezione tra PPV (n=14).

Un'ulteriore analisi è stata poi condotta per il pool di aziende (n=19) per le quali sono disponibili monitoraggi diagnostici sia per il 2019 che per il 2020. Pur essendo frutto di un campionamento di convenienza, nella popolazione campionata longitudinalmente possiamo verificare, descrittivamente, dei trend di prevalenza per anno per i diversi PPV (Tabella 4).

Tabella 4: prevalenze dei PPV sul totale delle 19 aziende ri-campionate nel biennio 2019-2020 e di cui si riporta il trend di variazione epidemiologico.

Anno	Prevalenze patogeno (conteggio e frequenza relativa)						
	PPV1	PPV2	PPV3	PPV4	PPV5	PPV6	PPV7
2019	3 (15,8%)	2 (10,5%)	5 (26,3%)	1 (5,3%)	1 (5,3%)	4 (21,1%)	3 (15,8%)
2020	5 (26,3%)	0 (0%)	3 (15,8%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (15,8%)	2 (10,5%)
Trend	+2 (+66,7%)	-2 (-100,0%)	-2 (-40,0%)	-1 (-100,0%)	-1 (-100,0%)	-1 (-25%)	-1 (-33,3%)

Il trend in calo per le nuove specie di PPV appare di difficile interpretazione, considerando l'esiguo numero di aziende monitorate, la mancanza di un campionamento attivo e di informazioni sulla patogenesi e sulla protezione immunitaria, relativamente a queste nuove specie. Tanti sono infatti i fattori che potrebbero influenzare il calo delle positività, quali ad esempio la riforma delle scrofe positive, un maggiore/minore livello di biosicurezza o l'acquisizione di un'immunità neutralizzante. L'unico PPV per il quale è stato evidenziato un trend positivo nei due anni è il PPV1, anche se soltanto un'azienda ha contribuito con la

positività sia nel 2019 che nel 2020. L'unico altro parvovirus che è stato identificato in entrambi gli anni nella stessa azienda è il PPV7.

Alla luce di queste considerazioni, però, per queste aziende in cui è stato possibile raccogliere campioni longitudinali durante la routine diagnostica standardizzata, appare interessante fare un'ulteriore sintesi, per comprendere quanti allevamenti abbiano mostrato un mantenimento della positività, un'alternanza o la negatività da un anno all'altro (Tabella 5).

Tabella 5: distribuzione delle aziende a seconda dello stato di negatività, mantenimento o alternanza delle positività tra il 2019 e il 2020. Il totale relativo si riferisce alle 19 aziende testate entrambi gli anni.

Stato positività	Tipo positività	Totale aziende		Totale relativo	
Positività 2019 e 2020	stesso PPV	2	6	10,5%	31,6%
	PPV diversi	4		21,1%	
Positività solo 2019	una sola specie	4	7	21,1%	36,8%
	per più PPV	3		15,8%	
Positività solo 2020	una sola specie	2	4	10,5%	21,1%
	per più PPV	2		10,5%	
Negatività	tutte le specie	3	3	15,8%	15,8%

Solo apparentemente è il 2019 ad aver registrato le più alte positività per i PPV1-7: un'azienda era infatti contemporaneamente positiva per lo stesso PPV nei due anni e per specie diverse nel 2019 (positività per tre specie nel 2019). Complessivamente, le aziende che hanno registrato uno stato di mantenimento nel biennio 2019-2020 e quelle che sono risultate positive ad una sola specie solo nel 2019 rappresentano quindi la maggioranza, in egual misura.

Quest'analisi più dettagliata conferma quindi il trend in calo per la maggior parte dei PPV (Tabella 4). Una base campionaria più ampia e un approccio standardizzato nell'ambito di una sorveglianza attiva avrebbero permesso però di attribuirvi maggiore significato.

4.2 PPV1-7 e altri patogeni: prevalenze e co-infezioni

Verranno ora presentati i risultati relativamente alle prevalenze dei PPV in relazione alle co-infezioni con gli altri patogeni ricercati nelle analisi preliminari condotte presso l'IZSLER, riguardanti sia il totale delle aziende che quelle testate in entrambi gli anni (Tabella 6). Le analisi sono state condotte su tutte le 163 aliquote, tranne che per il PCV-3 per il quale è stato possibile testarne solo 107. Nel complesso, le aziende testate per PCV-3 sono 65, di cui 35 testate solo nel 2019, 23 nel 2020, e 7 in entrambi gli anni.

Tabella 6: prevalenze degli agenti infettivi sul totale delle aziende campionate (n=80).

*Prevalenze del PCV-3 su 35 aziende nel 2019, su 23 aziende nel 2020; per 7 aziende è stato testato sia nel 2019 che nel 2020. Il totale fa quindi riferimento alle sole 65 aziende testate per PCV-3.

Anno	Prevalenze patogeno (conteggio e frequenza relativa)							
	PPV1	PPV2-7	Batteriologicalo	PRRSV	PCV-2	PCV-3*	Leptospira spp.	Chlamydia spp.
2019	3 (6,7%)	19 (42,2%)	11 (24,4%)	7 (15,6%)	14 (31,1%)	10 (23,8%)	0 (0%)	3 (6,7%)
2020	17 (31,5%)	19 (35,2%)	12 (22,2%)	14 (25,9%)	18 (33,3%)	1 (3,3%)	4 (7,4%)	1 (1,9%)
Totale	20 (25,0%)	38 (47,5%)	23 (28,8%)	21 (26,3%)	32 (40,0%)	11 (16,9%)	4 (5,0%)	6 (7,5%)

Dalle analisi preliminari condotte presso l'IZSLER, il patogeno maggiormente identificato è il PCV-2, seguito dal PRRSV. In generale, le co-infezioni tra PCV-2 e almeno una specie di PPV si sono rilevate abbastanza comuni, come suggerito da studi precedenti (Milek et al., 2020), essendo state descritte nel 23,8% (19/80) del totale delle aziende testate (n=80) e nel 59,4% (19/32) di quelle positive per PCV-2 (n=32).

Le prevalenze registrate per il batteriologico sono suddivise tra le positività per *S.suis* ed *E.coli*. Più precisamente, delle 11 positività al batteriologico nel 2019, il 54,5% (6/11) è relativo ad *E.coli* e il 45,5% (5/11) a *S. suis*; nel 2020 la prevalenza è uguale fra i due patogeni (6/12; 50%).

Per comprendere la rilevanza di questi agenti patogeni in co-infezione con i PPV, è stata eseguita un'analisi del subset di aziende risultate positive al PPV1 (Figura 10) e, separatamente, ai PPV2-7 (Figura 11).

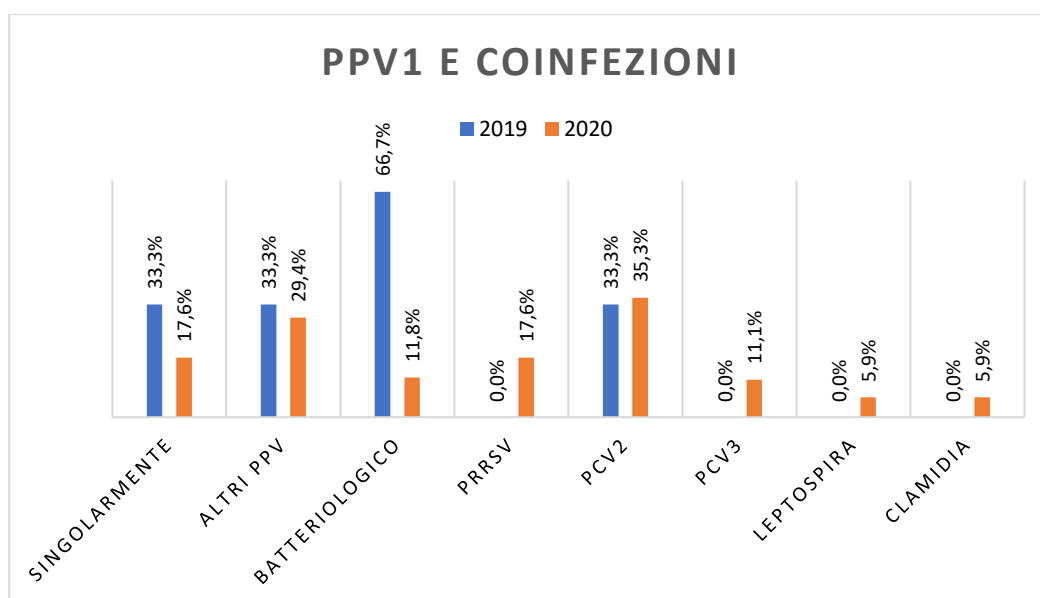


Figura 10: prevalenze del PPV1 come patogeno puro e in co-infezione con gli altri patogeni nel 2019 e nel 2020. Le percentuali sono riferite ad un numero totale di aziende positive a PPV1 pari a 3 nel 2019 e 17 nel 2020. Nel 2019 l'unica azienda positiva a PPV1 è stata testata anche per PCV-3; delle 3 aziende positive esclusivamente per PPV1 nel 2020, solo una è stata testata anche per PCV-3.

Le frequenze relative al 2019, dato l'esiguo numero di campioni risultati positivi a PPV1 (n=3), appaiono meno robuste rispetto a quelle del 2020 (n=17). Per questo motivo, il commento rispetto agli agenti in co-infezione viene riportato solo per i risultati del 2020.

Nel 2020 il PPV1 si trova con una maggiore frequenza insieme ad altri PPV, piuttosto che singolarmente. Questo non è in contraddizione con il trend delle nuove specie di PPV riportato in tabella 4, ma indica che nel 2020 sono più le aziende contemporaneamente positive per PPV1 e le nuove specie, rispetto a quelle positive solo per PPV1.

Il PPV1 è stato trovato in co-infezione con altri patogeni potenzialmente responsabili (primariamente o facoltativamente) di *reproductive failure* nella maggior parte delle aziende. Esso è stato identificato con una maggiore prevalenza assieme al PCV-2, e mantiene una certa costanza nei due anni. In altri paesi, la positività al PCV-2 in feti abortiti positivi a PPV1 è arrivata a toccare valori pari al 40% (2/tot 5 feti positivi a PPV1) (Sharma & Saikumar, 2010) e 60% (3/tot 5 feti positivi a PPV1) (C. Huang et al., 2004). Queste prevalenze non sono però del tutto paragonabili con i valori riportati in Figura 10, considerando che fanno riferimento a singoli feti raccolti rispettivamente da un'unica azienda o da diversi casi di aborto. Nelle analisi condotte in questo studio, infatti, le positività delle singole aliquote sono state raggruppate per azienda, in modo da fare riferimento alla circolazione del virus negli allevamenti negli anni 2019 e 2020. Un dato maggiormente paragonabile con quanto descritto negli altri paesi sarebbe quello relativo alla prevalenza del PCV-2 sul totale delle aliquote risultate positive a PPV, che si riduce ad un 23,8% (5/21).

Nel 50% (2/4) delle aziende in cui è stata ritrovata co-infezione tra PPV1 e un batterio fra *S. suis* ed *E.coli*, non sono stati identificati altri patogeni. Anche le aziende co-infette con PPV1 e PCV-2 nel 2020 (n=6), non hanno mostrato altre positività, se non per le nuove specie di PPV (3/6; 50%). Queste evidenze potrebbero suggerire un'azione sinergica del PPV1 sulla patologia causata dagli altri agenti. Sebbene la vaccinazione per PPV1 protegga dalla malattia, il fatto che questa permetta l'infezione, la replicazione e la trasmissione virale, non esclude infatti un possibile effetto di potenziamento da parte del PPV1 nel meccanismo patogenetico del *reproductive failure* causato da altri patogeni. Al contrario, il vaccino non sterilizzante, insieme alle infezioni pure per il PPV1 (Figura 10), merita di essere guardato con attenzione, principalmente sotto tre punti di vista:

- 1) Effetto sinergico del PPV1 in co-infezione con altri patogeni: per gran parte delle aziende, il PPV1 è stato trovato in co-infezione con altri patogeni potenzialmente responsabili (primariamente o facoltativamente) di *reproductive failure* (Figura 10). L'infezione da PPV1, non impedita dalla vaccinazione, anche se non responsabile direttamente di aborto, potrebbe comunque agire secondo un meccanismo sinergico sull'azione patogena degli altri agenti infettivi, quali ad esempio PCV-2 (Afolabi et al., 2019; Allan et al., 1999; Altherr et al., 2003; Kim & Chae, 2004; Kim et al., 2002; Pescador et al., 2007; Sun et al., 2015).
- 2) Possibile inefficacia del vaccino per nuovi ceppi di PPV1: nel 2019 e nel 2020, su un totale di 3 e 17 aziende risultate positive per PPV1, una (33,3%) e 3 (17,6%) aziende rispettivamente non hanno mostrato co-infezione per nessun altro patogeno, imputando, plausibilmente, al PPV1 la responsabilità del fallimento riproduttivo. Questi risultati, se da un lato possono essere dovuti ad una vaccinazione non svolta correttamente, dall'altro permettono anche di supporre una possibile inefficacia del vaccino nel prevenire la malattia, potenzialmente a causa di uno dei tanti ceppi virulenti per i quali l'immunità non sembra essere completamente neutralizzante (Zeeuw et al., 2007).
- 3) Possibile ruolo del vaccino come *driver* di evoluzione: quanto descritto nel punto precedente sul possibile coinvolgimento di altri ceppi patogeni di PPV1, relativamente alle aziende in cui i feti sono risultati positivi solo per PPV1, sarebbe compatibile con una potenziale evoluzione favorita da un *leaky-vaccine* come quello per il PPV1. L'utilizzo di un vaccino che permette la trasmissione e la circolazione virale, in una situazione di endemia come quella che caratterizza il PPV1, rappresenta lo scenario perfetto per favorire l'*antigenic escape*, alla base di una *vaccine-driven epitope evolution* (Read & Mackinnon, 2010).

I risultati di questo studio hanno permesso anche di analizzare le prevalenze dei nuovi PPV singolarmente e in co-infezione con gli altri patogeni (Figura 11), fornendo così un primo dato epidemiologico anche della loro circolazione insieme ad un patogeno importante come il PRRSV.

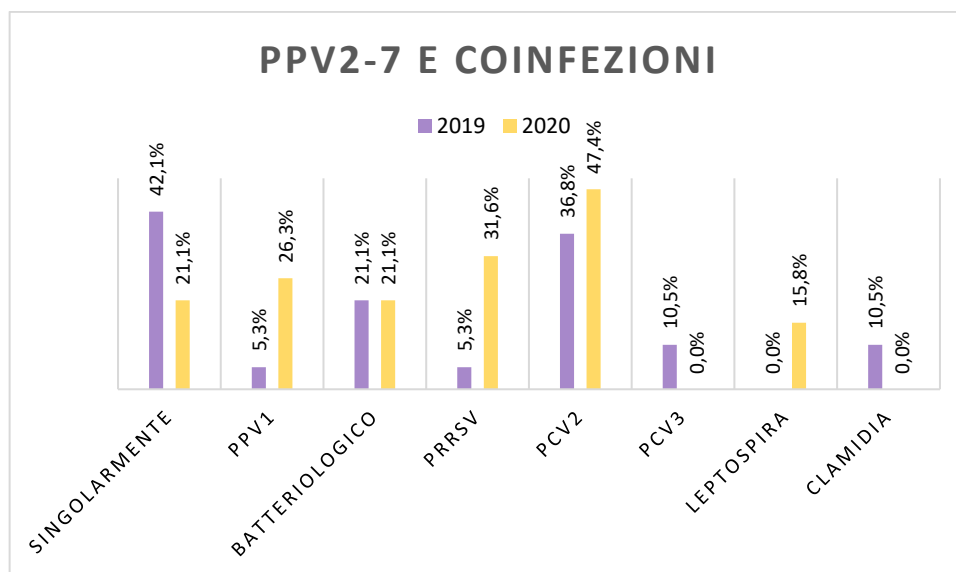


Figura 11: prevalenze dei PPV2-7 presenti singolarmente e in co-infezione con gli altri patogeni. Nel 2019, tutte le 8 aziende positive per PPV2-7 sono state testate anche per PCV-3; delle 4 aziende positive esclusivamente per PPV2-7 nel 2020, solo 2 sono state testate anche per PCV-3. Le percentuali sono riferite ad un numero totale di aziende positive a PPV2-7 pari a 19 sia nel 2019 che nel 2020.

In questo studio, almeno una specie tra i PPV2-7 è stata trovata in co-infezione con il PCV-2 in più di un terzo e in quasi la metà dei casi positivi per PPV2-7 (n=19), rispettivamente nel 2019 e nel 2020. Livelli simili di co-infezione sono stati descritti anche in altri studi recenti (Milek et al., 2020).

Ciò che è interessante, è il rilevamento delle nuove specie di PPV in casi di *reproductive failure*, in assenza di altri patogeni, più noti e che normalmente rientrano nella diagnostica di routine della patologia riproduttiva. Nello specifico, i nuovi PPV sono stati rilevati singolarmente nel 17,8% (8/45) e nel 7,4% (4/54) dei casi rispettivamente nel 2019 e nel 2020. Appare quindi utile mettere in evidenza quali sono le specie di PPV che più frequentemente sono state identificate singolarmente nelle aziende analizzate in questo studio, per anno (Tabella 7).

Tabella 7: allevamenti positivi solo a una o più specie di PPV2-7, e negativi per tutti gli altri patogeni testati. Il totale relativo fa riferimento alle aziende elencate nella prima colonna (n=8 nel 2019 e n=4 nel 2020).

*Aziende non testate per PCV-3.

2019	PPV2	PPV3	PPV4	PPV5	PPV6	PPV7	Numero di PPV
BS21		1					1
CR6	1	1			1		3
MN3		1					1
BG2		1					1
BG4					1		1
BG5						1	1
BS29					1		1
PN1		1			1	1	3
Totale assoluto	1	5	0	0	4	2	
Totale relativo 2019	12,5%	62,5%	0,0%	0,0%	50,0%	25,0%	
2020	PPV2	PPV3	PPV4	PPV5	PPV6	PPV7	Numero di PPV
BS16						1	1
BS3*					1		1
BS32		1			1		2
CR5*							1
Totale assoluto	0	1	0	0	2	1	
Totale relativo 2020	0,0%	25,0%	0,0%	0,0%	50,0%	25,0%	

Nessuna azienda ha registrato una positività esclusivamente per i PPV4-5: nell'unica azienda risultata positiva per PPV4 e PPV5 co-circolavano anche il PCV-3, *Chlamydia spp.* e *S. suis*. Il PPV2 è l'unico a essere stato individuato sempre in co-infezione con una delle altre specie tra PPV3,6,7. I parvovirus che più frequentemente sono stati rilevati in assenza di qualsiasi altro patogeno sono il PPV3 nel 2019, e il PPV6 nel 2020, che, come già descritto, sono quelli che più spesso sono stati individuati in co-infezione con altri parvovirus.

Nessuna azienda ha mantenuto lo stato di infezione singola per almeno una delle nuove specie di PPV, anche se, tra le aziende rappresentate in tabella 7, nel 2020, si individua anche l'unica (BS16) che ha mantenuto la stessa positività, specificatamente per PPV7, tra il 2019 e il 2020: solo nel 2020 non risulta in co-infezione con nessun altro patogeno. Questa, nel 2019 era in co-infezione con il PPV1, PPV6 e *S. suis*. A onor del vero, nel 2020 questa azienda non è stata testata per il PCV-3, anche se precedentemente (nel 2019) negativa.

Il fatto di aver individuato tutte le nuove specie di PPV, ad eccezione di PPV4-5, in feti provenienti da aziende in cui si sono verificati focolai di *reproductive failure*, in assenza di altri patogeni comunemente responsabili di aborto, suggerisce un loro potenziale ruolo eziologico

primario nella patologia riproduttiva. Se esistevano già dei sospetti di una potenziale patogenicità per il PPV4,6,7 (Cságola et al., 2012; Ni et al., 2014; Ouh et al., 2018), e di un possibile ruolo come patogeno respiratorio per il PPV2 (Cságola et al., 2016; Novosel et al., 2018; Opriessnig et al., 2013; F. Wang et al., 2010), per il PPV3 questo studio rappresenta la prima evidenza che lo descrive come agente patogeno e, più specificatamente, come causa primaria di *reproductive failure*.

Pur essendo frutto di una sorveglianza passiva, nella popolazione campionata longitudinalmente (n=19), è possibile evidenziare dei trend di prevalenza per anno anche per i diversi patogeni (Tabella 8).

Tabella 8: prevalenze dei PPV e degli altri patogeni sulle aziende ri-campionate nel biennio 2019-2020. Il valore relativo si riferisce ad un numero assoluto di 19 aziende.

*Solo per PCV-3 i valori fanno riferimento alle sole 7 aziende testate per questo patogeno sia nel 2019 che nel 2020.

Anno	Prevalenze patogeno (conteggio e frequenza relativa)							
	PPV1	PPV2-7	Batteriológico	PRRSV	PCV-2	PCV-3*	Leptospira spp.	Chlamydia spp.
2019	3 (15,8%)	10 (52,6%)	5 (26,3%)	4 (21,1%)	5 (26,3%)	2 (28,6%)	0 (0%)	1 (5,3%)
2020	5 (26,3%)	6 (31,6%)	6 (31,6%)	7 (36,8%)	7 (36,8%)	0 (0%)	2 (10,5%)	1 (5,3%)
Trend	+2 (+66,7%)	-4 (-40,0%)	+1 (+20,0%)	+3 (+75,0%)	+2 (+40,0%)	-2 (-100%)	+2 (ND)	0 (0%)

Tutti i patogeni descritti in tabella, tranne i nuovi PPV e il PCV-3, hanno registrato un aumento della loro circolazione tra il 2019 e il 2020. L'analisi dei trend dei diversi patogeni potrebbe essere un utile strumento per monitorare il loro andamento alla luce anche delle informazioni relative alle misure di controllo e ad eventuali fattori di rischio che possono essere introdotti in azienda.

Nell'ottica di analizzare gli andamenti delle singole aziende per le quali sono disponibili risultati relativi al biennio, si rende interessante fare un'ulteriore sintesi per comprendere quanti di questi allevamenti hanno mostrato un comportamento di mantenimento o alternanza da un anno all'altro (Tabella 9). Nessuna azienda è risultata negativa ad una qualsiasi co-infezione nel biennio.

Tabella 9: distribuzione delle 19 aziende testate nel biennio 2019-2020 a seconda del mantenimento o alternanza dello stato di co-infezione dei PPV con gli altri patogeni virali e batterici, tra il 2019 e il 2020. Nessuna azienda è risultata negativa ad una qualsiasi co-infezione nel biennio 2019-2020. Le aziende riportate in giallo sono quelle che sono state testate per PCV-3 entrambi gli anni, mentre quelle scritte in rosso sono quelle che risultano positive per la stessa specie di PPV tra il 2019 e il 2020. Il numero relativo delle aziende è calcolato sul totale delle aziende campionate nel biennio (n=19).

*Aziende positive sia nel 2019 che nel 2020 al PCV-2 ma in co-infezione con specie diverse tra i nuovi PPV2-7.

Co-infezione PPV e Virus	Anno	ID aziendale			N° aziende	N°aziende relativo
Positive per PPV1 e PCV-2	2019	BS16			1	5,3%
	2020	MI1			1	5,3%
	2019 & 2020				0	0,0%
Positive per PPV2-7 e PCV-2	2019	BS16	BS4		2	10,5%
	2020	BG1	MI1		2	10,5%
	2019 & 2020	BS1*	BS22*		2	10,5%
Positive per PPV1 e PRRSV	2019				0	0,0%
	2020	BS5	MN1		2	10,5%
	2019 & 2020				0	0,0%
Positive per PPV2-7 e PRRSV	2019	LO1			1	5,3%
	2020	BS1	MN1		2	10,5%
	2019 & 2020				0	0,0%
Positive per PPV1 e PCV-3	2019				0	0,0%
	2020				0	0,0%
	2019 & 2020				0	0,0%
Positive per PPV2-7 e PCV-3	2019	BS11			1	5,3%
	2020				0	0,0%
	2019 & 2020				0	0,0%

Co-infezione PPV e Batteri	Anno	ID aziendale			N° aziende	N°aziende relativo
Positive per PPV1 e Batteriologico	2019	BS16	BS5		2	10,5%
	2020	BS8			1	5,3%
	2019 & 2020				0	0,0%
Positive per PPV2-7 e Batteriologico	2019	BS11	BS16	MI1	3	15,8%
	2020	BG1	BS22		2	10,5%
	2019 & 2020				0	0,0%
Positive per PPV1 e Leptospira interrogans	2019				0	0,0%
	2020				0	0,0%
	2019 & 2020				0	0,0%
Positive per PPV2-7 e Leptospira interrogans	2019				0	0,0%
	2020	BS1	BS22		2	10,5%
	2019 & 2020				0	0,0%
Positive per PPV1 e Chlamydia spp.	2019				0	0,0%
	2020	BS8			1	5,3%
	2019 & 2020				0	0,0%
Positive per PPV2-7 e Chlamydia spp.	2019	BS11			1	5,3%
	2020				0	0,0%
	2019 & 2020				0	0,0%

Nessuna delle due aziende risultate positive per lo stesso PPV tra il 2019 e il 2020 (riportate in rosso nella tabella), lo sono in co-infezione sempre con gli stessi patogeni. La maggior parte delle aziende positive alle co-infezioni tra il PPV1 e gli altri virus analizzati si è registrata nel 2020, soprattutto per PCV-2. Nel 2019 e nel 2020 sono invece pari a due le aziende positive alla co-infezione tra PPV1 e gli agenti batterici ricercati. Nessuna azienda positiva a PPV1 ha mantenuto la stessa co-infezione tra i due anni.

Per quanto riguarda invece le nuove specie di PPV, soltanto due aziende hanno mantenuto lo stesso stato di co-infezione nel biennio 2019 e 2020, specificatamente con il PCV-2; tuttavia, queste aziende risultano positive per diverse specie di PPV nei due anni (PPV6 nel 2019 e PPV3 nel 2020 e viceversa). Distribuendo queste due aziende nei corrispettivi anni, i PPV2-7 sono stati identificati in co-infezione con gli agenti virali nel 31,6% (6/19) e con gli agenti batterici nel 21,1% (4/19) del totale delle aziende campionate (n=19), sia nel 2019 che nel 2020. Questo dato aiuta a comprendere l'entità della co-infezione tra le nuove specie di PPV e gli altri agenti patogeni che vengono di norma imputati come agenti responsabili di *reproductive failure*.

5 CONCLUSIONE

I risultati ottenuti in questo studio preliminare forniscono sia un aggiornamento epidemiologico sulla prevalenza del noto PPV1, che una prima identificazione delle nuove specie di PPV sul territorio italiano, in purezza e in co-infezione con altri patogeni comunemente responsabili di *reproductive failure*.

Le differenze riscontrate tra i dati forniti dall'IZSLER e quelli relativi a questo studio, pongono le basi per una futura rivalutazione e un *update* dei protocolli di diagnostica molecolare attualmente utilizzati.

Tra le criticità riscontrate, evidente appare il contrasto tra la sensibilità della metodica per PPV1 rispetto a quella per la ricerca di PPV4 e PPV5. La difficoltà nell'individuare soggetti positivi al PPV4 e PPV5, considerando la plausibilità epidemiologica della loro presenza, pone la necessità di una successiva fase sperimentale di ri-validazione del protocollo di PCR, per una rivalutazione dei campioni, in modo da superare eventuali limiti di sensibilità e specificità. Particolare attenzione sarà da dedicare al possibile ruolo giocato dalla stessa coppia di primer in condivisione tra PPV4-5 e dalle due sonde, nonostante non fossero riportati problemi di negatività inattesa nelle referenze da cui sono state ricavate le sequenze (Milek et al., 2019; Palinski et al., 2016). L'analisi dei campioni con metodiche separate e dedicate per PPV4 e PPV5 in singolo potrebbe permettere di ottimizzare le condizioni termiche per i singoli protocolli e, d'altra parte, una metodica di PCR classica seguita dal sequenziamento della regione target permetterebbe di confermare la specificità di eventuali positività. Un'eventuale analisi *in silico* sarà intrapresa come fase di ulteriore sviluppo diagnostico per assicurare la specificità dei primer e delle sonde.

Inoltre, lo sviluppo e la validazione di una metodica di sequenziamento garantiranno ulteriore supporto al protocollo, da un lato consentendo una conferma diagnostica in termini di specificità, dall'altro ponendo le basi per futuri studi filogenetici e di epidemiologia molecolare. Ciò permetterà inoltre di caratterizzare i PPV1 finora identificati e di individuare, anche sul territorio italiano, l'eventuale presenza di stipiti di particolare comportamento biologico. A partire da queste informazioni, sarà possibile approfondire l'informazione genetica tramite l'applicazione di modelli informatici per lo studio dell'evoluzione del patogeno, anche in riferimento all'interazione ospite-patogeno, e al ruolo dei vaccini in termini di pressione evolutivo-selettiva.

Il rilevamento dei PPV2-7 in co-infezione con agenti patogeni per i quali è già stato descritto un sinergismo con il PPV1, apre a nuovi risvolti clinici per queste nuove specie virali. Tuttavia, nonostante l'identificazione delle nuove specie come patogeni puri in focolai di *reproductive failure* suggerisca un potenziale ruolo clinico, è doveroso sottolineare come il rinvenimento di un agente patogeno non sia sufficiente a supportare il nesso causale. Pertanto, ulteriori studi dedicati e standardizzati, che prendano in considerazione varie matrici e categorie produttive, appaiono necessari per verificare il reale impatto delle nuove specie di parvovirus e descrivere la circolazione virale. Studi relativi al tropismo tissutale, allo spettro d'ospite, al ruolo in co-infezione e alla correlazione con altri fattori di rischio, potrebbero contribuire a fornire un quadro più completo del contesto epidemiologico, ponendo le basi per un miglioramento della gestione sanitaria dell'allevamento, dal punto di vista della diagnosi, del controllo e della profilassi per i patogeni attuali ed emergenti.

6 BIBLIOGRAFIA

- Adlhoch, C., Kaiser, M., Ellerbrok, H., & Pauli, G. (2010). High prevalence of porcine Hokovirus in German wild boar populations. *Virology Journal*, 7(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-171>
- Afolabi, K. O., Iweriebor, B. C., Obi, L. C., & Okoh, A. I. (2019). Prevalence of porcine parvoviruses in some South African swine herds with background of porcine circovirus type 2 infection. *Acta Tropica*, 190(October 2018), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.10.010>
- Alborali, L., Zanoni, M., Salogni, C., & Nigrelli, A. (2006). “Diagnostic approach to the sow reproductive pathology” “Diagnostica della patologia riproduttiva della scrofa”. *Atti Della Società Italiana Di Patologia Ed Allevamento Dei Suini (Italy)*, 32, 71–70.
- Allan, G. M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J. C., Ellis, J. A., Krakowka, S. J., Meehan, B. M., & Adair, B. M. (1999). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 121(1), 1–11. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1998.0295>
- Allan, Gordon M., & Ellis, J. A. (2000). Porcine circoviruses: A review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(1), 3–14. <https://doi.org/10.1177/104063870001200102>
- Altherr, B., Zimmermann, P., Etschmann, B., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Selbitz, H. J., & Truyen, U. (2003). *DETECTION OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) AND PORCINE PARVOVIRUS (PPV) IN ABORTED FETUSES*.
- Althouse, G. C., Kauffold, J., & Rossow, S. (2019). Diseases of the Reproductive System. In J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, & J. Zhang (Eds.), *Diseases of Swine, Eleventh Edition* (pp. 373–390). John Wiley & Sons, Inc.
- Althouse, G., & Rossow, K. (2011). The Potential Risk of Infectious Disease Dissemination Via Artificial Insemination in Swine. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(SUPPL. 2), 64–67. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01863.x>
- Andersson, M., Ahlberg, V., Jensen-Waern, M., & Fossum, C. (2011). Intestinal gene expression in pigs experimentally co-infected with PCV2 and PPV. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142(1–2), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.04.012>

- Antonietti, J. P., Sahli, R., Beard, P., & Hirt, B. (1988). Characterization of the cell type-specific determinant in the genome of minute virus of mice. *Journal of Virology*, 62(2), 552 LP – 557. <http://jvi.asm.org/content/62/2/552.abstract>
- Antonis, A. F. G., Bruschke, C. J. M., Rueda, P., Maranga, L., Casal, J. I., Vela, C., Hilgers, L. A. T., Belt, P. B. G. M., Weerdmeester, K., Carrondo, M. J. T., & Langeveld, J. P. M. (2006). A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, 24(26), 5481–5490. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.089>
- Bachmann, P. A., Sheffy, B. E., & Vaughan, J. T. (1975). Experimental in utero infection of fetal pigs with a porcine parvovirus. *Infection and Immunity*, 12(3), 455–460. <https://doi.org/10.1128/iai.12.3.455-460.1975>
- Bergeron, J., Hé Bert, B., & Tijssen, P. (1996). Genome Organization of the Kresse Strain of Porcine Parvovirus: Identification of the Allotropic Determinant and Comparison with Those of NADL-2 and Field Isolates. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 70, Issue 4).
- Bergeron, J., Menezes, J., & Tijssen, P. (1993). Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology*, 197(1), 86–98. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1569>
- Bolt, D. M., Hani, H., Muller, E., & Waldvogel, A. S. (1997). Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. *Journal of Comparative Pathology*, 117(2), 107–118. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(97\)80027-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80027-8)
- Brown, T. T., Paul, P. S., & Mengeling, W. L. (1980). Response of conventionally raised weanling pigs to experimental infection with a virulent strain of porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, 41(8), 1221–1224. <https://europepmc.org/article/med/7447115>
- Bruinsma, J. (2003). *World agriculture: towards 2015/2030, an FAO Perspective (Food Agric Organ United Nations)*.
- Bureau, M., Dea, S., & Sirard, M. A. (2005). Evaluation of virus decontamination techniques for porcine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 63(9), 2343–2355. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.034>

- Cadar, D., Cságola, A., Kiss, T., & Tuboly, T. (2013). Capsid protein evolution and comparative phylogeny of novel porcine parvoviruses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(1), 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.09.030>
- Cadar, D., Dán, Á., Tombácz, K., Lorincz, M., Kiss, T., Becskei, Z., Spînu, M., Tuboly, T., & Cságola, A. (2012). Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(6), 1163–1171. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.020>
- Cadar, Dániel, Cságola, A., Lorincz, M., Tombácz, K., Spînu, M., & Tuboly, T. (2011). Distribution and genetic diversity of porcine hokovirus in wild boars. *Archives of Virology*, 156, 2233–2239. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1125-6>
- Cadar, Dániel, Lorincz, M., Kiss, T., Novosel, D., Podgorska, K., Becskei, Z., Tuboly, T., & Cságola, A. (2013). Emerging novel porcine parvoviruses in Europe: Origin, evolution, phylodynamics and phylogeography. *Journal of General Virology*, 94(PART10), 2330–2337. <https://doi.org/10.1099/vir.0.055129-0>
- Cao, S., Chen, H., Zhao, J., Lü, J., Xiao, S., Jin, M., Guo, A., Wu, B., & He, Q. (2005). Detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus and porcine pseudorabies virus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR. *Veterinary Research Communications*, 29(3), 263–269. <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000047501.78615.0b>
- Cartwright, S. F., & Huck, R. . (1967). *Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. Vet. Rec. 81* (pp. 196–197).
- Cartwright, S. F., Lucas, M., & Huck, R. A. (1969). A small haemagglutinating porcine DNA virus. I. Isolation and properties. *Journal of Comparative Pathology*, 79(3). [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(69\)90053-x](https://doi.org/10.1016/0021-9975(69)90053-x)
- Chae, C. (2004). Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *The Veterinary Journal*, 168(1), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.09.018>
- Chang, S. F., Sgro, J. Y., & Parrish, C. R. (1992). Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *Journal of Virology*, 66(12), 6858–6867. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.12.6858-6867.1992>

- Chapman, M. S., & Rossmann, M. G. (1993). Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology*, 194(2), 491–508. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1288>
- Cheung, A. K., Wu, G., Wang, D., Bayles, D. O., Lager, K. M., & Vincent, A. L. (2010). Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. *Archives of Virology*, 155(5), 801–806. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0646-8>
- Chianini, F., Majó, N., Segalés, J., Domínguez, J., & Domingo, M. (2003). Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 94(1–2), 63–75. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(03\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(03)00079-5)
- Choi, C., & Chae, C. (1999). In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, 121(3), 265–270. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0315>
- Choi, C., & Chae, C. (2000). Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *Journal of Comparative Pathology*, 123(4), 302–305. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0421>
- Choi, C., Chae, C., & Clark, E. G. (2000). Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 12(2), 151–153. <https://doi.org/10.1177/104063870001200209>
- Choi, C. S., Molitor, T. W., Joo, H. S., & Gunther, R. (1987). Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Veterinary Microbiology*, 15(1–2), 19–29. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(87\)90125-8](https://doi.org/10.1016/0378-1135(87)90125-8)
- Cibulski, S. P., Teixeira, T. F., Varela, A. P. M., Scheffer, C. M., Santos, H. F., Lima, F. E. S., & Roehe, P. M. (2017). Ungulate copiparvovirus 2 in healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs. *Tropical Animal Health and Production*, 49(5), 945–949. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1279-7>
- Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Canuti, M., Chiorini, J. A., Eis-Hubinger, A. M., Hughes, J., Mietzsch, M., Modha, S., Ogliastro, M., Péntzes, J. J., Pintel, D. J., Qiu, J.,

- Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Lefkowitz, E. J., Davison, A. J., Siddell, S. G., Simmonds, P., ... Harrach, B. (2019). ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae. *Journal of General Virology*, 100(3), 367–368. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001212>
- Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J. A., Mukha, D. V., Pintel, D. J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., & Davison, A. J. (2014). The family Parvoviridae. *Archives of Virology*, 159(5), 1239–1247. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1914-1>
- Cságola, A., Lorincz, M., Cadar, D., Tombácz, K., Biksi, I., & Tuboly, T. (2012). Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Archives of Virology*, 157(6), 1003–1010. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1257-3>
- Cságola, A., Zádori, Z., Mészáros, I., & Tuboly, T. (2016). Detection of Porcine Parvovirus 2 (Ungulate Tetraparvovirus 3) Specific Antibodies and Examination of the Serological Profile of an Infected Swine Herd. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151036>
- Cui, J., Biernacka, K., Fan, J., Gerber, P. F., Stadejek, T., & Opriessnig, T. (2017). Circulation of Porcine Parvovirus Types 1 through 6 in Serum Samples Obtained from Six Commercial Polish Pig Farms. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(6), 1945–1952. <https://doi.org/10.1111/tbed.12593>
- Cutler, R., Molitor, T. W., Sauber, T. E., & Leman, A. D. (1982). Role of the rat in the transmission of porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, 43(3), 493–496.
- Cutlip, R. C., & Mengeling, W. L. (1975). Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of 8- and 10-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, 36, 1751–1754.
- Damm, B. I., Friggens, N. C., Nielsen, J., Ingvarsen, K. L., & Pedersen, L. J. (2002). Factors affecting the transfer of porcine parvovirus antibodies from sow to piglets. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 49(9), 487–495. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2002.00486.x>
- Darwich, L., Pié, S., Rovira, A., Segalés, J., Domingo, M., Oswald, I. P., & Mateu, E. (2003). Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. In *Journal of General Virology* (Vol. 84, Issue 8, pp. 2117–2125). J Gen Virol. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19124-0>

- Day, M. J., Horzinek, M. C., Schultz, R. D., & Squires, R. A. (2016). WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, 57(1), 4–8. <https://doi.org/10.1111/jsap.12431>
- De Souza, A. R., Yamin, M., Gava, D., Zanella, J. R. C., Gatti, M. S. V., Bonafe, C. F. S., & De Lima Neto, D. F. (2019). Porcine parvovirus VP1/VP2 on a time series epitope mapping: Exploring the effects of high hydrostatic pressure on the immune recognition of antigens. *Virology Journal*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1165-1>
- Dea, S., Elazhary, M. A. S. Y., Martineau, G. P., & Vaillancourt, J. (1985). Parvovirus-like particles associated with diarrhea in unweaned piglets. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 49(3), 343–345. [/pmc/articles/PMC1236185/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1236185/)
- Decaro, N., Buonavoglia, C., & Barrs, V. R. (2020). Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? In *Veterinary Microbiology* (Vol. 247, p. 108760). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108760>
- Demazeau, G., & Rivalain, N. (2011). The development of high hydrostatic pressure processes as an alternative to other pathogen reduction methods. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 110, Issue 6, pp. 1359–1369). J Appl Microbiol. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05000.x>
- Done, S. H., Paton, D. J., & White, M. E. G. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): A review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. In *British Veterinary Journal* (Vol. 152, Issue 2, pp. 153–174). Bailliere Tindall Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(96\)80071-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(96)80071-6)
- Drake, J. W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 4171–4175. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4171>
- 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? *OIE Revue Scientifique et Technique*, 30(1), 95–106. <https://doi.org/10.20506/rst.30.1.2020>
- Duffy, S., & Holmes, E. C. (2008). Phylogenetic Evidence for Rapid Rates of Molecular Evolution in the Single-Stranded DNA Begomovirus Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Journal of Virology*, 82(2), 957–965. <https://doi.org/10.1128/jvi.01929-07>

- Duffy, S., Shackelton, L. A., & Holmes, E. C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 9, Issue 4, pp. 267–276). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg2323>
- Duhamel, G. E., Bargar, T. W., Schmitt, B. J., Molitor, T. W., & Lu, W. (1991). Identification of parvovirus-like virus particles in intestinal crypt epithelial cells of pigs with diarrhea. In *J Vet Diagn Invest* (Vol. 3).
- Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., & Allan, G. M. (2004). Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiology*, 98(2), 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.10.008>
- Ellis, John, Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D., Bratanich, A., Clark, E., Allan, G., Konoby, C., Hassard, L., Meehan, B., Martin, K., Harding, J., Kennedy, S., & Mcneilly, F. (1999). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. In *J Vet Diagn Invest* (Vol. 11).
- Eterpi, M., McDonnell, G., & Thomas, V. (2009). Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *Journal of Hospital Infection*, 73(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.05.016>
- FAO. (2020). *Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets: June 2020*. <https://doi.org/10.4060/ca9509en>
- FAOSTAT. (2020). <http://www.fao.org/faostat/en/?#compare>
- Fernandes, S., Boisvert, M., & Tijssen, P. (2011). Genetic Elements in the VP Region of Porcine Parvovirus Are Critical to Replication Efficiency in Cell Culture. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 85(6), 3025–3029. <https://doi.org/10.1128/JVI.02215-10>
- Foerster, T., Streck, A. F., Speck, S., Selbitz, H. J., Lindner, T., & Truyen, U. (2016). An inactivated whole-virus porcine parvovirus vaccine protects pigs against disease but does not prevent virus shedding even after homologous virus challenge. *Journal of General Virology*, 97(6), 1408–1413. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000446>
- Foni, E., & Gualandi, G. L. (1989). A serological survey of swine parvovirus infection in Italy. *Microbiologica*, 12(3), 241–245.

- Ford, R. B., Larson, L. J., McClure, K. D., Schultz, R. D., & Welborn, L. V. (2017). 2017 AAHA Canine Vaccination Guidelines. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 53(5), 243–251. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6741>
- Garcia-Diaz, M., & Bebenek, K. (2007). Multiple functions of DNA polymerases. In *Critical Reviews in Plant Sciences* (Vol. 26, Issue 2, pp. 105–122). Taylor & Francis Group . <https://doi.org/10.1080/07352680701252817>
- Gava, D., Souza, C. K., Schaefer, R., Vincent, A. L., Cantão, M. E., Coldebella, A., & Ciacci-Zanella, J. R. (2015). A TaqMan-based real-time PCR for detection and quantification of porcine parvovirus 4. *Journal of Virological Methods*, 219, 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.03.011>
- Giammarioli, M., Pellegrini, C., Casciari, C., & De Mia, G. M. (2008). Development of a novel hot-start multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus. *Vet Res Commun*, 32, 255–262. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-9026-6>
- Guérin, B., & Pozzi, N. (2005). Viruses in boar semen: Detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. *Theriogenology*, 63(2 SPEC. ISS.), 556–572. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.030>
- Halbur. (2000). *Proceedings of the Swine Disease Conference for Swine Practitioners* (Vol. 8, pp. 113–123).
- Halbur. (2001). *Proceedings of the Swine Disease Conference for Swine Practitioners* (Vol. 9, pp. 162–166).
- Hao, X., Lu, Z., Sun, P., Fu, Y., Cao, Y., Li, P., Bai, X., Bao, H., Xie, B., Chen, Y., Li, D., & Liu, Z. (2011). Phylogenetic analysis of porcine parvoviruses from swine samples in China. *Virology Journal*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-320>
- Hasslung, F., Wallgren, P., Ladekjær-Hansen, A. S., Bøtner, A., Nielsen, J., Watrang, E., Allan, G. M., McNeilly, F., Ellis, J., Timmusk, S., Belák, K., Segall, T., Melin, L., Berg, M., & Fossum, C. (2005). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine

- circovirus type 2. *Veterinary Microbiology*, 106(1–2), 49–60.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.12.011>
- Hijikata, M., Abe, K., Win, K. M., Shimizu, Y. K., Keicho, N., & Yoshikura, H. (2001). Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 54(6), 244–245. <https://europepmc.org/article/med/11862009>
- Hogg, G. G., Lenghaus, C., & Forman, A. J. (1977). Experimental porcine parvovirus infection of foetal pigs resulting in abortion, histological lesions and antibody formation. *Journal of Comparative Pathology*, 87(4), 539–549. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(77\)90060-3](https://doi.org/10.1016/0021-9975(77)90060-3)
- Holtkamp, D. J. (2013). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production*, 21(2), 72–84.
- Huang, C., Hung, J. J., Wu, C. Y., & Chien, M. S. (2004). Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. *Veterinary Microbiology*, 101(3), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.04.007>
- Huang, L., Zhai, S. L., Cheung, A. K., Zhang, H. B., Long, J. X., & Yuan, S. S. (2010). Detection of a novel porcine parvovirus, PPV4, in chinese swine herds. *Virology Journal*, 7(1), 333. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-333>
- Hueffer, K., & Parrish, C. R. (2003). Parvovirus host range, cell tropism and evolution. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 6, Issue 4, pp. 392–398). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00083-3)
- Johnson, R. H. (1973). Isolation of swine parvovirus in Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 49(3), 157–159. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1973.tb06768.x>
- Johnson, R. H., Donaldson-wood, C., Jod, H. S., & Allender, U. (1976). Observations on the epidemiology of porcine parvovirus. *Australian Veterinary Journal*, 52(2), 80–84. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1976.tb13862.x>
- Joo, H. S., Donaldson-Wood, C. R., & Johnson, R. H. (1976). Observations on the Pathogenesis of Porcine Parvovirus Infection. In *Archives of Virology* (Vol. 51).

- Joo, H. S., & Donaldson-Wood, C. R. (1976). Rapid diagnostic techniques for detection of porcine parvovirus infection in mummified foetuses. *Australian Veterinary Journal*, 52(1), 51–52. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1976.tb05380.x>
- Joo, H. S., & Johnson, R. H. (1977). Serological responses in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus. *Australian Veterinary Journal*, 53(11), 550–552. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1977.tb07945.x>
- Jóźwik, A., Manteutel, J., Selbitz, H. J., & Truyen, U. (2009). Vaccination against porcine parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain. *Journal of General Virology*, 90(10), 2437–2441. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012054-0>
- Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., & Allan, G. M. (2000). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 122(1), 9–24. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0337>
- Kim, J., & Chae, C. (2001). Differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridisation. *Research in Veterinary Science*, 70(3), 265–269. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2001.0471>
- Kim, J., & Chae, C. (2004). Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. *Veterinary Journal*, 167(1), 104–106. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.09.011>
- Kim, J., Choi, C., & Chae, C. (2003). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 128(1), 52–59. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0605>
- Kim, J., Ha, Y., & Chae, C. (2006). Potentiation of porcine circovirus 2-induced postweaning multisystemic wasting syndrome by porcine parvovirus is associated with excessive production of tumor necrosis factor- α . *Veterinary Pathology*, 43(5), 718–725. <https://doi.org/10.1354/vp.43-5-718>

- Kim, Junghyun, & Chae, C. (2001). Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. *Journal of Virological Methods*, 92(2), 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00255-X](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00255-X)
- Kim, Junghyun, & Chae, C. (2003). Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. In *Canadian Journal of Veterinary Research* (Vol. 67, Issue 2, pp. 133–137). Canadian Veterinary Medical Association. [/pmc/articles/PMC227041/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/161227041/)
- Kim, Junghyun, Chung, H. K., Jung, T., Cho, W. S., Choi, C., & Chae, C. (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: Prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(1), 57–62. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.57>
- Kim, S. C., Jeong, C. G., Nazki, S., Lee, S. I., Baek, Y. C., Jung, Y. J., & Kim, W. Il. (2021). Evaluation of a multiplex PCR method for the detection of porcine parvovirus types 1 through 7 using various field samples. *PLoS ONE*, 16(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245699>
- Kiss, I., Kovács, E., Zádori, Z., Mészáros, I., Cságola, A., Bajnóczi, P., Mortensen, P., & Palya, V. (2020). <p>Vaccine Protection Against Experimental Challenge Infection with a PPV-27a Genotype Virus in Pregnant Gilts</p>. *Veterinary Medicine: Research and Reports, Volume 11*, 17–24. <https://doi.org/10.2147/vmrr.s236912>
- Klinge, K. L., Vaughn, E. M., Roof, M. B., Bautista, E. M., & Murtaugh, M. P. (2009). Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology Journal*, 6. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-177>
- Krakowka, S., Ellis, J. A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., & Allan, G. (2000). Viral wasting syndrome of swine: Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Pathology*, 37(3), 254–263. <https://doi.org/10.1354/vp.37-3-254>
- Kresse, J. I., Taylor, W. D., Stewart, W. W., & Eernisse, K. A. (1985). Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Veterinary Microbiology*, 10(6), 525–531. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(85\)90061-6](https://doi.org/10.1016/0378-1135(85)90061-6)

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kwit, K., Pomorska-Mól, M., & Markowska-Daniel, I. (2016). Czynniki zakaźne powodujące zaburzenia w rozrodzie świń. In *Medycyna Weterynaryjna* (Vol. 72, Issue 6, pp. 345–351). Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych. <https://doi.org/10.21521/mw.5523>
- Ladekjær-Mikkelsen, A. S., & Nielsen, J. (2002). A longitudinal study of cell-mediated immunity in pigs infected with porcine parvovirus. *Viral Immunology*, 15(2), 373–384. <https://doi.org/10.1089/08828240260066297>
- Lager, K. M., & Mengeling, W. L. (1994). Porcine parvovirus associated with cutaneous lesions in piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(3), 357–359. <https://doi.org/10.1177/104063879400600313>
- Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Tse, H., Fu, C. T. Y., Au, W. K., Chen, X. C., Tsoi, H. W., Tsang, T. H. F., Chan, J. S. Y., Tsang, D. N. C., Li, K. S. M., Tse, C. W. S., Ng, T. K., Tsang, O. T. Y., Zheng, B. J., Tam, S., Chan, K. H., Zhou, B., & Yuen, K. Y. (2008). Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *Journal of General Virology*, 89(8), 1840–1848. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000380-0>
- Leman, A. D., Straw, B. E., Mengeling, W. L., D’Allaire, S., & Taylor, D. J. (1992). Disease of Swine. In *Disease of Swine* (7th Editio). The Iowa State University Press.
- Lenghaus, C., Forman, A. J., & Hale, C. J. (1978). Experimental infection of 35, 50 and 60 day old pig foetuses with porcine parvovirus. *Australian Veterinary Journal*, 54(9), 418–422. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1978.tb05565.x>
- Li, S., Wei, Y., Liu, J., Tang, Q., & Liu, C. (2013). Prevalence of porcine hokovirus and its co-infection with porcine circovirus 2 in China. *Archives of Virology*, 158(9), 1987–1991. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1690-y>
- López-Bueno, A., Villarreal, L. P., & Almendral, J. M. (2006). Parvovirus variation for disease: A difference with RNA viruses? In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 299, pp. 349–370). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_13

- Lucas, M. H., Cartwright, S. F., & Wrathall, A. E. (1974). Genital infection of pigs with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 84(3), 347–350. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(74\)90008-5](https://doi.org/10.1016/0021-9975(74)90008-5)
- Lukashov, V. V., & Goudsmit, J. (2001). Evolutionary Relationships among Parvoviruses: Virus-Host Coevolution among Autonomous Primate Parvoviruses and Links between Adeno-Associated and Avian Parvoviruses. *Journal of Virology*, 75(6), 2729–2740. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.6.2729-2740.2001>
- Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., & Renukaradhya, G. J. (2016). *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System*. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>
- Madsen, E. S., Madsen, K. G., Nielsen, J., Jensen, M. H., Lei, J. C., & Have, P. (1997). Detection of antibodies against porcine parvovirus nonstructural protein NS1 may distinguish between vaccinated and infected pigs. *Veterinary Microbiology*, 54(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01270-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01270-9)
- Madson, D. M., Patterson, A. R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X. J., & Opriessnig, T. (2009). Effect of natural or vaccine-induced porcine circovirus type 2 (PCV2) immunity on fetal infection after artificial insemination with PCV2 spiked semen. *Theriogenology*, 72(6), 747–754. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.024>
- Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, P., de Kruif, A., & Van Soom, A. (2008). Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology*, 70(8), 1337–1345. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.018>
- Maldonado, J., Segalés, J., Martí Nez-Puig, D., Calsamiglia, M., Riera, P., Domingo, M., & Artigas, C. (2005). Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *The Veterinary Journal*, 169, 454–456. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.05.007>
- Mayr, A., & Mahnel, H. (1964). Züchtung von Schweinepestvirus in Schweinenieren-Kulturen mit cytopathogenem Effekt. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene. 1. Abt. Medizinisch-Hygienische Bakteriologie, Virusforschung Und Parasitologie. Originale*, 195(2), 157–166.

Meat and Dairy Production - Our World in Data. (2020). <https://ourworldindata.org/meat-production#citation>

Mengeling, W. L. (1972). Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. *American Journal of Veterinary Research*, 33(11), 2239–2248.

Mengeling, W. L. (1978). Prevalence of Porcine parvovirus-induced reproductive failure: an abattoir study. *PREVALENCE OF PORCINE PARVOVIRUS-INDUCED REPRODUCTIVE FAILURE: AN ABATTOIR STUDY.*, 172, 1291–1294.

Mengeling, W. L., Brown, T. T., Paul, P. S., & Gutekunst, D. E. (1979). Efficacy of an inactivated virus vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *American Journal of Veterinary Research*, 40(2), 204–207. <https://europepmc.org/article/med/464358>

Mengeling, W. L., & Cutlip, R. C. (1975). Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of 5-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, 36, 1173–1177.

Mengeling, W. L., & Cutlip, R. C. (1976). Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, 37(12), 1393–1400. <https://europepmc.org/article/med/999067>

Mengeling, W. L., Lager, K. M., & Vorwald, A. C. (2000). The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 199–210. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00135-4)

Mengeling, W. L., & Paul, P. S. (1981). Reproductive performance of gilts exposed to porcine parvovirus at 56 or 70 days of gestation. *American Journal of Veterinary Research*, 42(12), 2074–2076. <https://europepmc.org/article/med/7340578>

Mengeling, W. L., & Paul, P. S. (1986). Interepizootic survival of porcine parvovirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188(11), 1293–1295. <https://europepmc.org/article/med/3013820>

Mengeling, W. L., Paul, P. S., & Brown, T. T. (1980). Transplacental Infection and Embryonic Death Following Maternal Exposure to Porcine Parvovirus Near the Time of Conception. In *Archives of Virology* (Vol. 65).

- Mengeling, W. L., Pejsak, Z., & Paul, P. S. (1984). Biological assay of attenuated strain NADL-2 and virulent strain NADL-8 of porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 2403–2407.
- Milek, D., Woźniak, A., Guzowska, M., & Stadejek, T. (2019). Detection patterns of porcine parvovirus (PPV) and novel porcine parvoviruses 2 through 6 (PPV2–PPV6) in Polish swine farms. *Viruses*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/v11050474>
- Milek, D., Woźniak, A., Podgórska, K., & Stadejek, T. (2020). *Do porcine parvoviruses 1 through 7 (PPV1-PPV7) have an impact on porcine circovirus type 2 (PCV2) viremia in pigs?* <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108613>
- Milek, D., Woźniak, A., & Stadejek, T. (2018). The detection and genetic diversity of novel porcine parvovirus 7 (PPV7) on Polish pig farms. *Research in Veterinary Science*, 120, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.08.004>
- Molitor, T. W., Joo, H. S., & Collett, M. S. (1985). KBSH parvovirus: comparison with porcine parvovirus. *Journal of Virology*, 55(2), 257–263. <https://doi.org/10.1128/jvi.55.2.257-263.1985>
- Morgan, N., & Prakash, A. (2006). International livestock markets and the impact of animal disease. In *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Vol. 25, Issue 2). <http://faostat.fao.org>
- Narita, M., Inui, S., Kawakami, Y., Kitamura, K., & Maeda, A. (1975). Histopathological changes of the brain in swine fetuses naturally infected with porcine parvovirus. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*, 15, 24–28.
- Nash, W. A. (1990). Porcine parvovirus survey. *The Veterinary Record*, 126(7), 175–176.
- Nathues, C., Perler, L., Bruhn, S., Suter, D., Eichhorn, L., Hofmann, M., Nathues, H., Baechlein, C., Ritzmann, M., Palzer, A., Grossmann, K., Schüpbach-Regula, G., & Thür, B. (2016). An Outbreak of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Switzerland Following Import of Boar Semen. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(2), e251–e261. <https://doi.org/10.1111/tbed.12262>
- Ndze, V. N., Cadar, D., Cságola, A., Kisfali, P., Kovács, E., Farkas, S., Ngu, A. F., Esona, M. D., Dán, Á., Tuboly, T., & Bányai, K. (2013). Detection of novel porcine bocaviruses in fecal samples of asymptomatic pigs in Cameroon. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.006>

- Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Green, A. L., & Zimmerman, J. J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(3), 385–392. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.385>
- Ni, J., Qiao, C., Han, X., Han, T., Kang, W., Zi, Z., Cao, Z., Zhai, X., & Cai, X. (2014). Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in china. *Virology Journal*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0203-2>
- Norja, P., Eis-Hübinger, A. M., Söderlund-Venermo, M., Hedman, K., & Simmonds, P. (2008). Rapid Sequence Change and Geographical Spread of Human Parvovirus B19: Comparison of B19 Virus Evolution in Acute and Persistent Infections. *Journal of Virology*, 82(13), 6427–6433. <https://doi.org/10.1128/jvi.00471-08>
- Novosel, D., Cadar, D., Tuboly, T., Jungic, A., Stadejek, T., Ait-Ali, T., & Cságola, A. (2018). Investigating porcine parvoviruses genogroup 2 infection using in situ polymerase chain reaction. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1487-z>
- O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E. G., Konoby, C., Allan, G., & Ellis, J. A. (2001). Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Canadian Veterinary Journal*, 42(7), 551–553. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1476641/>?report=abstract
- OECD/FAO. (2020a). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*. <https://doi.org/10.1787/1112c23b-en>
- OECD/FAO. (2020b). “Table C.4 - World meat projections.” In O. Publishing (Ed.), *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*. <https://doi.org/10.1787/e481f6bb-en>
- Opriessnig, T., Fenaux, M., Yu, S., Evans, R. B., Cavanaugh, D., Gallup, J. M., Pallares, F. J., Thacker, E. L., Lager, K. M., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2004). Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, 98(3–4), 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.11.006>
- Opriessnig, Tanja, Gerber, P. F., Matzinger, S. R., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2017). Markedly different immune responses and virus kinetics in littermates infected with porcine

- circovirus type 2 or porcine parvovirus type 1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.08.003>
- Opriessnig, T., Shen, H. G., Pal, N., Ramamoorthy, S., Huang, Y. W., Lager, K. M., Beach, N. M., Halbur, P. G., & Meng, X. J. (2011). A live-attenuated chimeric porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine is transmitted to contact pigs but is not upregulated by concurrent infection with porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and is efficacious. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18, 1261–1268. <https://doi.org/10.1128/CVI.05057-11>.
- Opriessnig, Tanja, & Halbur, P. G. (2012). Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Research*, 164(1–2), 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.014>
- Opriessnig, Tanja, Xiao, C. T., Gerber, P. F., & Halbur, P. G. (2013). Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Veterinary Microbiology*, 163(1–2), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.019>
- Opriessnig, Tanja, Xiao, C. T., Gerber, P. F., & Halbur, P. G. (2014). Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. *Veterinary Microbiology*, 173(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.024>
- Oravainen, J., Heinonen, M., Tast, A., Virolainen, J. V., & Peltoniemi, O. A. T. (2005). High porcine parvovirus antibodies in sow herds: Prevalence and associated factors. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(1), 57–61. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00555.x>
- Ostanello, F., Caprioli, A., Di Francesco, A., Battilani, M., Sala, G., Sarli, G., Mandrioli, L., McNeilly, F., Allan, G. M., & Prosperi, S. (2005). Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, 108(3–4), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.010>
- Ouh, I. O., Park, S., Lee, J. Y., Song, J. Y., Cho, I. S., Kim, H. R., & Park, C. K. (2018). First detection and genetic characterization of porcine parvovirus 7 from Korean domestic pig farms. *Journal of Veterinary Science*, 19(6), 855–857. <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.6.855>

- Ouyang, T., Zhang, X., Liu, X., & Ren, L. (2019). Co-infection of swine with porcine circovirus type 2 and other swine viruses. *Viruses*, *11*(2), 185. <https://doi.org/10.3390/v11020185>
- Palinski, R. M., Mitra, N., & Hause, B. M. (2016). Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. *Virus Genes*, *52*(4), 564–567. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1322-1>
- Pallarés, F. J., Halbur, P. G., Opriessnig, T., Sorden, S. D., Villar, D., Janke, B. H., Yaeger, M. J., Larson, D. J., Schwartz, K. J., Yoon, K. J., & Hoffman, L. J. (2002). Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *14*(6), 515–519. <https://doi.org/10.1177/104063870201400614>
- Pan, Y., Zeng, Q., Zhu, C., Hua, X., Wang, M., Pan, K., & Cui, L. (2012). Frequency and characterization of porcine hokovirus (PHoV) in domestic pigs in eastern China. *Archives of Virology*, *157*(9), 1785–1788. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1350-7>
- Parrish, C. R. (1991). Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology*, *183*(1), 195–205. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90132-U](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90132-U)
- Parrish, C. R., & Carmichael, L. E. (1986). Characterization and recombination mapping of an antigenic and host range mutation of canine parvovirus. *Virology*, *148*(1), 121–132. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90408-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90408-3)
- Paton, D. J., & Done, S. H. (2002). Viral infections of pigs: Trends and new knowledge. *Journal of Comparative Pathology*, *127*(2–3), 77–95. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0571>
- Paul, P. S., & Mengeling, W. L. (1980). Evaluation of a modified live-virus vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive disease in swine. *American Journal of Veterinary Research*, *41*(12), 2007–2011. <https://europepmc.org/article/med/7212434>
- Paul, P. S., & Mengeling, W. L. (1984). Oronasal and intramuscular vaccination of swine with a modified live porcine parvovirus vaccine: multiplication and transmission of the vaccine virus. *American Journal of Veterinary Research*, *45*(12), 2481–2485. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6098202/>

- Paul, P. S., Mengeling, W. L., & Brown, T. T. (1979). Replication of porcine parvovirus in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*, 25(3), 1003–1007. <https://doi.org/10.1128/iai.25.3.1003-1007.1979>
- Paul, P. S., Mengeling, W. L., & Brown, T. T. (1980). Effect of vaccinal and passive immunity on experimental infection of pigs with porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, 41(9), 1368–1371. <https://europepmc.org/article/med/7447129>
- Paul, P. S., Mengeling, W. L., & Pirtle, E. C. (1982). Duration and biological half-life of passively acquired colostrum antibodies to porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, 43(8), 1376–1379. <https://europepmc.org/article/med/7103222>
- Pénzes, J. J., Söderlund-Venermo, M., Canuti, M., Eis-Hübing, A. M., Hughes, J., Cotmore, S. F., & Harrach, B. (2020). Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Archives of Virology*, 165(9), 2133–2146. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04632-4>
- Pescador, C. A., Bandarra, P. M., Castro, L. A., Antoniassi, N. A. B., Ravazzolo, A. P., Sonne, L., Cruz, C. E. F., & Driemeier, D. (2007). Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 27(10), 425–429. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2007001000007>
- Pozzi, P. S., & Alborali, G. L. (2012). Reproductive Diseases in Sows (*Sus scrofa domestica*): A Review. In *Article in Israel Journal of Veterinary Medicine* (Vol. 67, Issue 1). <https://www.researchgate.net/publication/263541549>
- Prieto, C., Suárez, P., Simarro, I., García, C., Martín-Rillo, S., & Castro, J. M. (1997). Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, 47(3), 647–654. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00023-X)
- Qing, L., Lv, J., Li, H., Tan, Y., Hao, H., Chen, Z., Zhao, J., & Chen, H. (2006). The recombinant nonstructural polyprotein NS1 of porcine parvovirus (PPV) as diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated pigs. *Veterinary Research Communications*, 30(2), 175–190. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3212-9>
- Rasbech, N. O. (1969). A review of the causes of reproductive failure in swine. *The British Veterinary Journal*, 125(12), 599–616. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)48607-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)48607-6)

- Read, A. F., & Mackinnon, M. J. (2010). Pathogen evolution in a vaccinated world. *Evolution in Health and Disease*, 139–152. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199207466.003.0011>
- Renken, C., Nathues, C., Swam, H., Fiebig, K., Weiss, C., Eddicks, M., Ritzmann, M., & Nathues, H. (2021). Application of an economic calculator to determine the cost of porcine reproductive and respiratory syndrome at farm-level in 21 pig herds in Germany. *Porcine Health Management*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00183-x>
- Robles-Sikisaka, R., Bohonak, A. J., McClenaghan, L. R., & Dhar, A. K. (2010). Genetic signature of rapid IHHNV (Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus) expansion in wild *Penaeus* shrimp populations. *PLoS ONE*, 5(7), 11799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011799>
- Rodibaugh, M. (2002). Defining today's disease complexes. *Nat. Hog Farm.*, 12, 32.
- Rossow, K. D. (1998). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. In *Veterinary Pathology* (Vol. 35, Issue 1, pp. 1–20). American College of Veterinary Pathologists Inc. <https://doi.org/10.1177/030098589803500101>
- Ruckerbauer, G. M., & Dulac Boulanger, G. C. P. (1978). Demonstration of parvovirus in Canadian swine and antigenic relationships with isolates from other countries. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 42(3), 278–285. [/pmc/articles/PMC1277639/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1277639/)
- Rudek, Z., & Kwiatkowska, L. (1983). The possibility of detecting fetal lymphocytes in the maternal blood of the domestic pig, *Sus scrofa*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 36(3), 580–583. <https://doi.org/10.1159/000131976>
- Saekhow, P., & Ikeda, H. (2015). Prevalence and genomic characterization of porcine parvoviruses detected in Chiangmai area of Thailand in 2011. *Microbiology and Immunology*, 59(2), 82–88. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12218>
- Saekhow, P., Kishizuka, S., Sano, N., Mitsui, H., Akasaki, H., Mawatari, T., & Ikeda, H. (2016). Coincidental detection of genomes of porcine parvoviruses and porcine circovirus type 2 infecting pigs in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(12), 1581–1586. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0167>
- Sarli, G., Morandi, F., Panarese, S., Bacci, B., Ferrara, D., Bianco, C., Fusaro, L., Bacci, M. L., 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 Veterinaria Scandinavica*, 54(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-51>
- Schirtzinger, E. E., Suddith, A. W., Hause, B. M., & Hesse, R. A. (2015). First identification of porcine parvovirus 6 in North America by viral metagenomic sequencing of serum from pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus Other viruses (e.g. pox, papilloma, parvo, reoviridae). *Virology Journal*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0401-6>
- Segalés, J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. In *Virus Research* (Vol. 164, Issues 1–2, pp. 10–19). Virus Res. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.007>
- Shackelton, L. A., Hoelzer, K., Parrish, C. R., & Holmes, E. C. (2007). Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *Journal of General Virology*, 88(12), 3294–3301. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83255-0>
- Shackelton, L. A., & Holmes, E. C. (2006). Phylogenetic Evidence for the Rapid Evolution of Human B19 Erythrovirus. *Journal of Virology*, 80(7), 3666–3669. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.7.3666-3669.2006>
- Shackelton, L. A., Parrish, C. R., Truyen, U., & Holmes, E. C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 379 LP – 384. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406765102>
- Shangjin, C., Cortey, M., & Segalés, J. (2009). Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. *Virus Research*, 140(1–2), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.11.003>
- Sharma, R., & Saikumar, G. (2010). Porcine parvovirus- and porcine circovirus 2-associated reproductive failure and neonatal mortality in crossbred Indian pigs. *Tropical Animal Health and Production*, 42(3), 515–522. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9454-0>
- Shearer, A. E. H., & Kniel, K. E. (2009). High hydrostatic pressure for development of vaccines. *Journal of Food Protection*, 72(7), 1500–1508. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.7.1500>

- Siegl, G. (1976). The parvoviruses. In *Virology monographs*. (Vol. 15, pp. 47–52). Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8430-1>
- Silva, J. L., Barroso, S. P. C., Mendes, Y. S., Dumard, C. H., Santos, P. S., Gomes, A. M. O., & Oliveira, A. C. (2015). Pressure-inactivated virus: A promising alternative for vaccine production. *Subcellular Biochemistry*, 72, 301–318. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9918-8_15
- Silva, J. L., Oliveira, A. C., Vieira, T. C. R. G., De Oliveira, G. A. P., Suarez, M. C., & Foguel, D. (2014). High-pressure chemical biology and biotechnology. In *Chemical Reviews* (Vol. 114, Issue 14, pp. 7239–7267). Chem Rev. <https://doi.org/10.1021/cr400204z>
- Simpson, A. A., Hébert, B., Sullivan, G. M., Parrish, C. R., Zádori, Z., Tijssen, P., & Rossmann, M. G. (2002). The structure of porcine parvovirus: Comparison with related viruses. *Journal of Molecular Biology*, 315(5), 1189–1198. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5319>
- Sliz, I., Vlasakova, M., Jackova, A., & Vilcek, S. (2015). Characterization of porcine parvovirus type 3 and porcine circovirus type 2 in wild boars (*Sus scrofa*) in Slovakia. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(3), 703–711. <https://doi.org/10.7589/2015-01-005>
- Soares, Rodrigo M., Durigon, E. L., Bersano, J. G., & Richtzenhain, L. J. (1999). Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *Journal of Virological Methods*, 78(1–2), 191–198. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00177-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00177-3)
- Soares, Rodrigo Martins, Cortez, A., Bryan Heinemann, M., Myioshi Sakamoto, S., Geraldo Martins, V., Bacci, M., Maria de Campos Fernandes, F., José Richtzenhain, L., & Rodrigo Soares rosoares, C. (2003). Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. *Journal of General Virology*, 84, 1505–1515. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19011-0>
- Souza, C. K., Streck, A. F., Gonçalves, K. R., Pinto, L. D., Ravazzolo, A. P., de Barcellos, D. E. dos S. N., & Canal, C. W. (2016). Phylogenetic characterization of the first ungulate tetraparvovirus 2 detected in pigs in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 513–517. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.025>

- Steitz, T. A. (1990). Structural studies of protein-nucleic acid interaction: The sources of sequence-specific binding. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 23(3), 205–280. <https://doi.org/10.1017/S0033583500005552>
- Streck, A. F., Bonatto, S. L., Homeier, T., Souza, C. K., Gonçalves, K. R., Gava, D., Canal, C. W., & Truyen, U. (2011). High rate of viral evolution in the capsid protein of porcine parvovirus. *Journal of General Virology*, 92(11), 2628–2636. <https://doi.org/10.1099/vir.0.033662-0>
- Streck, A. F., Canal, C. W., & Truyen, U. (2015). Molecular epidemiology evolution of porcine parvoviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 36, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.007>
- Streck, A. F., Homeier, T., Foerster, T., Fischer, S., & Truyen, U. (2013). Analysis of porcine parvoviruses in tonsils and hearts from healthy pigs reveals high prevalence and genetic diversity in Germany. *Archives of Virology*, 158(6), 1173–1180. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1603-0>
- Streck, A. F., Homeier, T., Foerster, T., & Truyen, U. (2013). Population dynamics and in vitro antibody pressure of porcine parvovirus indicate a decrease in variability. *Journal of General Virology*, 94, 2050–2055. <https://doi.org/10.1099/vir.0.052555-0>
- Streck, A. F., & Truyen, U. (2020). Porcine Parvovirus. *Current Issues in Molecular Biology*, 37, 33–46. <https://doi.org/10.21775/cimb.037.033>
- Sun, J., Huang, L., Wei, Y., Wang, Y., Chen, D., Du, W., Wu, H., & Liu, C. (2015). Prevalence of emerging porcine parvoviruses and their co-infections with porcine circovirus type 2 in China. *Archives of Virology*, 160(5), 1339–1344. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2373-7>
- Suzuki, H., & Fujisaki, Y. (1976). Immunizing effects of inactivated porcine parvovirus vaccine on piglets. *Bull. Nat. Inst. Anim. Health*, 72, 17–23.
- Szelei, J., Liu, K., Li, Y., Fernandes, S., & Tijssen, P. (2010). Parvovirus 4-like virus in blood products. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3), 561–564. <https://doi.org/10.3210/eid1603.090746>
- Thacker, B. J., Joo, H. S., Winkelman, N. L., & Leman, A. D. and Barnes, D. M. (1987). Clinical, virologic, and histopathologic observations of induced parvovirus infection in boars. *American Journal of Veterinary Research*, 48, 763–766.

- Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S. F., Obermaier, B., Veijalainen, P., & Parrish, C. R. (1995). Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *Journal of Virology*, 69(8), 4702 LP – 4710. <http://jvi.asm.org/content/69/8/4702.abstract>
- Truyen, U., & Streck, A. F. (2019). Porcine Parvovirus. In J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, & J. Zhang (Eds.), *Disease of Swine 11th Edition* (11th Editi, pp. 611–621). Wiley-Blackwell.
- Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T. J., Rossmann, M. G., Compans, R. W., & Parrish, C. R. (1991). The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*, 251(5000), 1456–1464. <https://doi.org/10.1126/science.2006420>
- Umemura, T., Tanaka, Y., Kiyosawa, K., Alter, H. J., & Shih, J. W. K. (2002). Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus). *FEBS Letters*, 510(3), 171–174. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03258-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03258-6)
- Van Ballegooijen, W. M., Van Houdt, R., Bruisten, S. M., Boot, H. J., Coutinho, R. A., & Wallinga, J. (2009). Molecular sequence data of hepatitis B virus and genetic diversity after vaccination. *American Journal of Epidemiology*, 170(12), 1455–1463. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp375>
- VanderWaal, K., & Deen, J. (2018). Global trends in infectious diseases of swine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(45), 11495–11500. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806068115>
- Vannier, P., Brun, A., Chappuis, G., & Reynaud, G. (1986). *Study of the efficacy of an inactivated virus against porcine parvovirus*. (Vol. 17, Issue 4). <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00901678>
- Vasudevacharya, J., & Compans, R. W. (1992). The NS and capsid genes determine the host range of porcine parvovirus. *Virology*, 187(2), 515–524. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90454-W](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90454-W)
- Wang, F., Wei, Y., Zhu, C., Huang, X., Xu, Y., Yu, L., & Yu, X. (2010). Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. *Virus Genes*, 41(2), 305–308. <https://doi.org/10.1007/s11262-010-0506-3>

- Wang, Y., Yang, K. kan, Wang, J., Wang, X. peng, Zhao, L., Sun, P., & Li, Y. dong. (2019). Detection and molecular characterization of novel porcine parvovirus 7 in Anhui province from Central-Eastern China. *Infection, Genetics and Evolution*, 71(March), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.004>
- West, K. H., Bystrom, J. M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G. M., Haines, D. M., Clark, E. G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., & Ellis, J. A. (1999). Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(6), 530–532. <https://doi.org/10.1177/104063879901100608>
- Whitaker, H. K., Neu, S. M., & Pace, L. W. (1990). Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2(3), 244–246. <https://doi.org/10.1177/104063879000200322>
- Wilhelm, S., Zeeuw, E.J.L., S. H. (2005). Tissue distribution of fiel isolates and two vaccine strains of porcine parvovirus in foetal organs after experimental infection of pregnant sows as determined by real-time PCR. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 52(Infect.Dis. Vet. Public. Health), 323–326.
- Wu, R., Wen, Y., Huang, X., Wen, X., Yan, Q., Huang, Y., Ma, X., & Cao, S. (2014). First complete genomic characterization of a porcine parvovirus 5 isolate from China. *Archives of Virology*, 159(6), 1533–1536. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1948-4>
- Xia, X., & Yuen, K. Y. (2005). Differential selection and mutation between dsDNA and ssDNA phages shape the evolution of their genomic AT percentage. *BMC Genetics*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-20>
- Xiao, C. T., Gerber, P. F., Giménez-Lirola, L. G., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2013). Characterization of porcine parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA. *Veterinary Microbiology*, 161(3–4), 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.038>
- Xiao, C. T., Giménez-Lirola, L. G., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2012). Increasing porcine PARV4 prevalence with pig age in the U.S. pig population. *Veterinary Microbiology*, 160(3–4), 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.038>

- Xiao, C. T., Giménez-Lirola, L. G., Jiang, Y. H., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2013). Characterization of a Novel Porcine Parvovirus Tentatively Designated PPV5. *PLoS ONE*, 8(6), e65312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065312>
- Xie, Q., & Chapman, M. S. (1996). Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 264(3), 497–520. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0657>
- Xing, X., Zhou, H., Tong, L., Chen, Y., Sun, Y., Wang, H., & Zhang, G. (2018). First identification of porcine parvovirus 7 in China. *Archives of Virology*, 163, 209–213. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3585-9>
- Zádori, Z., Szelei, J., & Tijssen, P. (2005). SAT: a Late NS Protein of Porcine Parvovirus. *Journal of Virology*, 79(20), 13129–13138. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.20.13129-13138.2005>
- Zeeuw, E. J. L., Leinecker, N., Herwig, V., Selbitz, H.-J., & Truyen, U. (2007). Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *Journal of General Virology*, 88, 420–427. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82302-0>
- Zhang, H. B., Huang, L., Liu, Y. J., Lin, T., Sun, C. Q., Deng, Y., Wei, Z. Z., Cheung, A. K., Long, J. X., & Yuan, S. S. (2011). Porcine bocaviruses: Genetic analysis and prevalence in Chinese swine population. *Epidemiology and Infection*, 139(10), 1581–1586. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000847>
- Zhao, H., Zhao, G., & Wang, W. (2016). Susceptibility of porcine preimplantation embryos to viruses associated with reproductive failure. *Theriogenology*, 86(7), 1631–1636. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.004>
- Zimmerman, J., Epperson, W., Robert, D. J., Wills, W., & McKean, J. D. (1997). *Results of the recent survey of the membership of the AASP for outbreaks of sow abortion and mortality*. <http://www.aasp.org/shap/issues/v5n2/index.html>
- Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W., & Zhang, J. (2019). *Diseases of Swine* (W. Blackwell (Ed.); 11th editi). <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1964.tb04494.x>

Zimmermann, P., Ritzmann, M., Selbitz, H.-J., Heinritzi, K., & Truyen, U. (2006). VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *Journal of General Virology*, 87, 295–301. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81086-0>

RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto, vorrei ringraziare il Professor Drigo per aver compreso la mia voglia di approfondire quest'ambito della veterinaria, coinvolgendomi con costante fiducia in un progetto stimolante e di ampio respiro. A tal proposito, non posso non ringraziare la Dottoressa Claudia Maria Tucciarone, che con la sua schietta, energica e premurosa dedizione, mi ha fatto subito sentire accolta e coinvolta nel progetto. Ringrazio inoltre il Dottor Giovanni Franzo, che oltre ad aver messo a disposizione la sua competenza nel confronto sulle possibili prospettive di questo studio, ha pazientemente sopportato le mie lezioni online nel suo ufficio.

Vorrei inoltre ringraziare il Dottor Giovanni Loris Alborali, nonché tutto il personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, per il materiale fornito e per avermi permesso di svolgere un'esperienza di tirocinio in cui ho potuto comprendere l'intero processo diagnostico che non solo sta dietro ai campioni oggetto di questo studio, ma anche all'importante servizio che ogni giorno, strutture come queste, sono chiamate ad offrire.