



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Corso di laurea specialistica in Medicina Veterinaria

DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA E
IGIENE VETERINARIA

TESI DI LAUREA

METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATI ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2)

Relatore: Dott. Michele Drigo

Correlatore: Dott.ssa Alessandra Mondin

Laureando: Giovanni Franzo

ANNO ACCADEMICO: 2010-2011

INDICE

| | |
|---|-----------|
| INDICE | 1 |
| INTRODUZIONE | 3 |
| ABBREVIAZIONI | 5 |
| 1. CENNI STORICI DELLA MALATTIA | 7 |
| 2. ASPETTI EZIOPATOGENETICI, IMMUNOLOGICI, CLINICI E ANATOMOPATOLOGICI | 9 |
| 2.1. EZIOLOGIA | 9 |
| 2.1.1. Tassonomia e Filogenesi | 9 |
| 2.1.2. Caratteristiche fisico-chimiche | 11 |
| 2.1.3. Ciclo di replicazione | 15 |
| 2.2. PATOGENESI | 17 |
| 2.2.1. Suinetti | 17 |
| 2.2.2. Scrofe | 22 |
| 2.2.3. Verro | 23 |
| 2.3. IMMUNITÀ | 24 |
| 2.3.1. Immunità umorale | 24 |
| 2.3.2. Immunità cellulo-mediata | 26 |
| 2.3.3. Immunità materna | 27 |
| 2.3.4. Immunosoppressione | 28 |
| 2.4. SEGNI CLINICI, LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE E ISTOPATOLOGICHE | 28 |
| 3. EPIDEMIOLOGIA | 35 |
| 3.1. SPETTRO D'OSPITE | 35 |
| 3.2. TRASMISSIONE VIRALE | 35 |
| 3.2.1. Trasmissione orizzontale | 35 |
| 3.2.2. Trasmissione verticale | 37 |
| 3.3. DISTRIBUZIONE | 38 |
| 3.4. FATTORI DI RISCHIO | 40 |
| 3.4.1. Variazioni nella virulenza di PCV2 | 40 |
| 3.4.2. Coinfezioni e immunomodulazione | 42 |
| 3.4.3. Fattori legati all'ospite | 44 |
| 3.4.4. Fattori manageriali e ambientali | 44 |
| 4. DIAGNOSI | 47 |
| 4.1.1. Diagnosi clinica e anatomoistopatologica | 48 |
| 4.1.2. Sierologia | 49 |
| 4.1.3. Identificazione virale e degli antigeni | 50 |
| 4.1.4. Rilevamento degli acidi nucleici | 52 |
| 4.1.5. Caratterizzazione di PCV2 | 53 |
| 5. PREVENZIONE E CONTROLLO | 55 |
| 5.1. PREVENZIONE | 55 |
| 5.2. CONTROLLO | 56 |
| 5.2.1. Interventi gestionali | 57 |
| 5.2.2. Vaccini | 61 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 6. | <i>rt-PCR</i> | 67 |
| 6.1. | INTRODUZIONE | 67 |
| 6.2. | PRINCIPI BASE DI PCR | 68 |
| 6.3. | REAL-TIME PCR | 70 |
| 6.3.1. | SYBR® green I | 71 |
| 6.3.2. | Sonde fluorescenti | 73 |
| 6.3.3. | Quantificazione | 74 |
| 7. | <i>SCOPO DELLA TESI</i> | 77 |
| 8. | <i>MATERIALI E METODI</i> | 79 |
| 8.1. | CAMPIONI | 79 |
| 8.2. | CONSERVAZIONE REAGENTI | 79 |
| 8.3. | DATABASE | 80 |
| 8.4. | PRODUZIONE DI CLONI BATTERICI CONTENENTI LE SEQUENZE DI INTERESSE DA UTILIZZARE COME STANDARD PER LA QUANTIFICAZIONE | 80 |
| 8.5. | CURVE STANDARD | 83 |
| 8.6. | CONTROLLO INTERNO | 83 |
| 8.7. | ESTRAZIONE DEL DNA DAI CAMPIONI DI TESSUTO | 84 |
| 8.8. | VALIDAZIONE | 85 |
| 8.9. | SPECIFICITÀ : PCV1 vs PCV2 | 86 |
| 8.10. | REAL TIME-PCR SUI CAMPIONI SPERIMENTALI | 87 |
| 8.11. | CAMPIONI SPERIMENTALI: ANALISI STATISTICA | 88 |
| 9. | <i>RISULTATI E DISCUSSIONE</i> | 89 |
| 9.1. | PRODUZIONE DI CLONI BATTERICI CONTENENTI LE SEQUENZE DI INTERESSE DA UTILIZZARE COME STANDARD PER LA QUANTIFICAZIONE | 89 |
| 9.2. | CURVE STANDARD | 90 |
| 9.3. | CONTROLLO INTERNO | 91 |
| 9.3.1. | Probe | 92 |
| 9.3.2. | SYBR Green I | 93 |
| 9.3.3. | Degradazione degli standard. | 94 |
| 9.4. | ESTRAZIONE DEL DNA DAI CAMPIONI DI TESSUTO | 95 |
| 9.5. | VALIDAZIONE | 96 |
| 9.6. | SPECIFICITÀ :PCV1 vs PCV2 | 98 |
| 9.7. | rt-PCR SUI CAMPIONI SPERIMENTALI E ANALISI STATISTICA | 101 |
| 9.7.1. | Metodiche | 101 |
| 9.7.2. | Matrici | 103 |
| 10. | <i>CONCLUSIONI</i> | 115 |
| 11. | <i>BIBLIOGRAFIA</i> | 119 |
| 12. | <i>SITOGRAFIA</i> | 133 |
| 13. | <i>RINGRAZIAMENTI</i> | 135 |

INTRODUZIONE

Le dinamiche del mercato impongono anche nel settore suinicolo una rigorosa gestione del processo produttivo ed una continua ricerca di elevate performance sia a livello del singolo animale che dell'allevamento nel suo complesso. La necessità di limitare i costi, massimizzando i profitti e mantenendosi competitivi sul mercato, impone un'attenta analisi e controllo del rapporto costi/benefici nelle scelte aziendali. Non si deve tuttavia trascurare come in molti casi le scelte gestionali si fondino più su una tendenza al risparmio che su una reale ponderazione dei diversi fattori determinanti la redditività finale dell'azienda. Questo contesto sovente si traduce in pratiche di allevamento che si discostano radicalmente dalle condizioni ideali sia in termini sanitari che di benessere animale. Un management condizionato da questi principi, pur con i dovuti distinguo, ha condotto verso un sistema di allevamento caratterizzato da eccessiva densità di popolazione, da un'inadeguata gestione degli ambienti, delle prassi di allevamento, del personale, delle misure di biosicurezza ecc.

Ciò ha contribuito all'emergere di patologie che si fondano o comunque traggono enormi benefici da un quadro come quello sopra descritto. Tra queste, la *Porcine Circovirus Disease* (PCVD), pur presentando una eziologia multifattoriale, riconosce come determinante necessario, ma non sufficiente, un agente infettivo. La necessità della presenza di co-fattori nell'esplicarsi della patologia ha reso impossibile definire una relazione biunivoca fra l'infezione e lo sviluppo di malattia. Data la rilevanza economica di queste sindromi, si rende necessario lo sviluppo di metodiche diagnostiche in grado di risolvere questo dualismo. In un contesto ideale queste dovrebbero essere caratterizzate da un'elevata sensibilità e specificità, praticità, rapidità ed economicità di esecuzione. Di fondamentale importanza sarebbe la possibilità di sfruttare tale strumento anche al fine di monitorare gli esiti degli interventi gestionali, ambientali o vaccinali messi in atto.

L'utilizzo delle moderne metodiche di biologia molecolare, in particolare nella forma della rt-PCR, offre importanti vantaggi in tal senso come evidenziato dal progressivo incremento nell'utilizzo di questa tecnologia in ambito microbiologico.

Nel presente studio si è quindi cercato di perfezionare e comparare criticamente due metodiche di rt-PCR, rivolte all'identificazione e quantificazione di PCV2 in diversi tessuti, al fine di valutarne le potenzialità nella pratica diagnostica.

ABBREVIAZIONI

| | |
|-----------------|--|
| ADV | <i>Aujeszky's disease virus</i> |
| BALT | Bronchial associated lymphoid tissue |
| CCR5 | C-C chemokine receptor type 5 |
| CNS | Central nervous system |
| CSFV | <i>Classical swine fever virus</i> |
| CT | Congenital tremor |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| IFA/FA | Indirect fluorescent antibody assay/fluorescent antibody assay |
| IHC | Immunohistochemistry |
| IM | Intramuscolare |
| IPMA | Immunoperoxidase monolayer assay |
| INF γ SC | Interferon-gamma-secreting cells |
| ISH | In situ hybridization |
| LOD | Limit of detection |
| ME | Microscopio elettronico |
| NFQ | Non-fluorescent quencher |
| ORF | Open reading frame |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PCVAD | Porcine circovirus-associated disease |
| PCVD | Porcine circovirus disease |
| PDNS | Porcine dermatitis and nephropathy syndrome |
| PMBC | Peripheral blood mononuclear cells |
| PMWS | Postweaning multisystemic wasting syndrome |
| PNP | Proliferative and necrotising pneumonia |
| PPV | <i>Porcine parvovirus</i> |
| PRDC | Porcine respiratory disease complex |
| PRRSV | <i>Porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i> |
| RER | Reticolo endoplasmatico ruvido |
| SIV | <i>Swine influenza virus</i> |
| T _M | Temperatura di <i>melting</i> |
| Ybp | Year before present |

1. CENNI STORICI DELLA MALATTIA

L'esistenza di *Porcine Circovirus* (PCV) è nota fin dal 1974 (Tischer et al.,1974), anno della prima descrizione di un virus, poi denominato PCV1, contaminante le culture cellulari PK-15. Tuttavia non sono note manifestazioni cliniche ad esso associate e, allo stato attuale delle conoscenze, viene considerato non patogeno.

Nel 1996 Harding e Clark descrissero una nuova sindrome, la PMWS (post-weaning multisystemic wasting syndrome), riconosciuta per la prima volta in Canada nel 1991. Un importante passo verso l'identificazione dell'agente eziologico avvenne due anni più tardi con l'isolamento di un nuovo circovirus suino (PCV2) da tessuti di suini affetti da PMWS (Ellis et al., 1998) e successivamente con la riproduzione sperimentale della patologia in animali gnotobiotici (Clark et al., 1999). Appare comunque importante evidenziare come, a causa dei caratteri di multifattorialità della malattia, tale associazione sia rimasta a lungo incerta e siano stati necessari ulteriori studi per riconoscere PCV2 come l'agente eziologico primario della patologia. Nei successivi anni PCV2 è stato associato a una pluralità di manifestazioni cliniche complessivamente denominate PCVD (Porcine Circovirus Disease) in Europa (Segalés et al., 2005a) o PCVAD (Porcine Circovirus Associated Disease) nel Nord America (Opriessnig et al., 2007b). Oltre a PMWS sono state infatti descritte forme di Porcine Dermatitis and Nephropathy Sindrome (PDNS) (Rosell et al., 2000), di Disordini Riproduttivi (West et al., 1999), di Enterite (Kim et al., 2004c), di Proliferative and Necrotizing Pneumonia (PNP) (Drolet et al., 2003), di Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) (Kim et al., 2003c), di Epidermide Essudativa (Kim et Chae,2004b) e di Congenital Tremor (CT) (Stevenson et al., 2001). A partire dai primi report canadesi, nuove segnalazioni di PCVD si sono susseguite nei diversi stati, evidenziando una distribuzione mondiale di PCV2. Casi di PMWS (e in generale di PCVD) sono stati infatti riportati in tutti i continenti con la sola eccezione dell'Australia (fig. 1).



Fig. 1. Stati in cui sono stati riportati casi di PMWS. Tratto da Grau-Roma (2010)

Per quanto concerne il quadro europeo i primi casi sono stati segnalati in Spagna e Francia nel 1997, per poi interessare sostanzialmente tutto il territorio dell' UE nei successivi anni (tab. 1). È tuttavia di primaria importanza sottolineare come quanto riportato faccia riferimento solamente all'evidenziazione clinica della patologia. Data la complessità della stessa e la compartecipazione di diversi co-fattori nella determinazione della sintomatologia una visione del genere appare senza

| STATO | ANNO |
|-----------------|------|
| SPAGNA | 1997 |
| FRANCIA | 1997 |
| IRLANDA | 1998 |
| ITALIA | 1999 |
| GERMANIA | 1999 |
| BELGIO | 2000 |
| OLANDA | 2000 |
| UNGHERIA | 2000 |
| SVIZZERA | 2001 |
| GRECIA | 2002 |
| SVEZIA | 2002 |
| REPUBBLICA CECA | 2002 |

Tab. 1. Primi report di PMWS in Europa

dubbio parziale e fuorviante, non rispondente alla reale storia evolutiva del patogeno. Uno studio retrospettivo condotto nel nord della Germania ha infatti evidenziato la presenza di DNA di PCV2 in tessuti suini già nel 1962. Nel medesimo studio viene altresì evidenziato un aumento significativo dell'incidenza di PCV2 successivamente al 1985 in associazione alla comparsa delle lesioni istologiche caratteristiche di PMWS e PDNS, prima non riscontrate (Jacobsen et al., 2009). In altre parole PCV2 era endemico in Germania, e presumibilmente a livello mondiale, ben prima del 1991, senza tuttavia dare sintomatologia clinica o, quantomeno, essere diagnosticato. Fattori terzi, non ancora del tutto risolti, avrebbero giocato un ruolo determinante nella manifestazione, quasi sincrona sulle due sponde dell'atlantico, delle PCVD. Recentemente, a partire dal 2004, una fondamentale svolta nell'ambito del controllo di queste sindromi è stata rappresentata dallo sviluppo e registrazione di vaccini commerciali e dalla progressiva diffusione del loro utilizzo a livello mondiale (Opriessnig et al., 2007b; Martelli et al., 2011).

2. ASPETTI EZIOPATOGENETICI, IMMUNOLOGICI, CLINICI E ANATOMOPATOLOGICI

2.1. EZIOLOGIA

2.1.1. Tassonomia e Filogenesi

PCV2 appartiene al genere *Circovirus* a sua volta classificato, assieme al genere *Gyrovirus*, nella famiglia *Circoviridae*. La famiglia *Circoviridae* è strettamente legata alla famiglia *Nanoviridae*, comprendente virus vegetali, con la quale condivide analogie strutturali nell'ambito dell'origine di replicazione e nelle proteine implicate nella replicazione stessa. Analoghe caratteristiche sono condivise anche con i *Geminivirus* delle piante. È stato quindi speculato che i *Circovirus* possano rappresentare il “link genetico” fra le due famiglie di virus vegetali. È stato inoltre proposto che il progenitore di PCV1 sia originato dall'infezione di ospiti vertebrati da parte di un *Nanovirus* vegetale ricombinatosi con un RNA virus, probabilmente un *Calicivirus*, avente come spettro d'ospite dei vertebrati (Gillespie et al., 2009). Attualmente nel genere *Circovirus* sono classificate le seguenti specie: *beak and feather disease virus*, *canary circovirus*, *goose circovirus*, *pigeon circovirus*, PCV1, PCV2 e le provvisorie *duck circovirus*, *finch circovirus* e *gull circovirus*.

Le infezioni, tipicamente limitate a uno spettro d'ospite molto ristretto, possono dare origine a condizioni meramente subcliniche o manifestarsi con quadri differenti a seconda della specie virale considerata. Fra le principali patologie si ricordano la Beak and feather disease, la *Circovirus disease* del piccione e la PCVD nel suino. In diverse specie le circovirosi causano gradi variabili di deplezione linfocitaria e si ritiene abbiano un'azione immunosoppressiva.

Come precedentemente accennato la comparsa di PCVD non rispecchia né in senso temporale né spaziale la reale diffusione di PCV2. Un ulteriore aiuto in tal senso ci arriva da recenti studi di filogenesi (Firth et al., 2009) che hanno permesso di ricostruire l'evoluzione di questo patogeno, evidenziando un quadro ben più complesso di quanto non fosse stato inizialmente supposto.

La divergenza evolutiva fra *circovirus* aviari e suini viene collocata all'incirca cinquecento anni fa. In considerazione del fatto che la separazione fra la classe Aves e Mammalia è antecedente di circa trecento milioni di anni l'opinione attuale tende, sebbene non vi sia una concordanza assoluta, ad escludere che vi sia stata una progressiva co-evoluzione della famiglia *Circoviridae* con le diverse specie ospite. La mancanza di una congruenza topologica e temporale fra la filogenesi dei *Circovirus* e delle rispettiva specie ospite suggerisce che questi non abbiano

condiviso una lunga storia evolutiva. Si ritiene infatti che PCV si sia originato come conseguenza di un salto di specie fra gli uccelli e il suino domestico, probabilmente attraverso un passaggio intermedio nel cinghiale. L'origine di PCV2 e PCV1 viene invece ricondotta ai primi anni del '900.

Sebbene studi iniziali negassero la presenza di significative differenze genetiche nella popolazione virale, alcuni articoli (Gagnon et al., 2007; Carman et al., 2008; Timmusk et al., 2008), poi confermati dalla successiva letteratura, hanno posto in evidenza la presenza di due distinti genotipi: PCV2a e PCV2b. Si stima che PCV2a sia originato 41ybp mentre PCV2b solamente 18ybp, ossia in un intorno del 1991. A differenza di quanto si potrebbe supporre è stato rilevato come non vi sia stata continuità fra i due. Le due clade hanno condiviso un progenitore comune e avrebbero avuto un'evoluzione indipendente pur circolando contemporaneamente. Come PCV2a e PCV2b siano rimasti geneticamente distinti pur presentando un medesimo spettro d'ospite e distribuzione geografica è tuttora dibattuto. In effetti nel 2008 è stata segnalata una ricombinazione fra PCV2a e PCV2b, sebbene il significato biologico e clinico sia ancora da elucidare (Hesse et al., 2008). Sempre nel 2008 è stato proposto un terzo genotipo PCV2c (Dupont et al., 2008), attualmente riscontrato solo in Danimarca. Sebbene non sia scopo di questo capitolo, è importante rilevare alcuni elementi di interesse inerenti alla comparsa di PCV2b: (I) vi è una coincidenza temporale fra questo evento e i primi report di PMWS; (II) PCV2b è il genotipo più rappresentato nei recenti campionamenti ed è con maggior frequenza associato a sintomatologia; (III) vi è una tendenza ad un aumento della diversità genetica in PCV2b che non si riscontra in PCV2a.

Esulando dalla prospettiva storica e andando a considerare la tendenza del patogeno a sviluppare mutazioni nel proprio genoma si sono riscontrati una serie di elementi utili alla comprensione del potenziale evolutivo dello stesso e delle potenzialità e limiti dei mezzi diagnostici incentrati sull'analisi del materiale genetico.

Il tasso di sostituzione nucleotidico di PCV2 è stato stimato essere $1,2 \times 10^{-3}$ sostituzioni/sito/anno, più elevato di qualsiasi altro virus a ssDNA e confrontabile per ordine di grandezza con quello di virus a ssRNA. Ciò appare inusuale per un virus che per la propria replicazione sfrutta l'apparato sintetico cellulare rappresentato da DNA polimerasi dell'ospite, dotate di attività proofreading. In contraddizione con quanto appena riportato vi è tuttavia l'evidenza che la diversità genetica, per entrambi i genotipi, è estremamente bassa e caratterizzata, pur con alcune eccezioni, da mutazioni silenti e quindi irrilevanti per quanto concerne il profilo aminoacidico. È quindi probabile la presenza di una forte selezione purificante o l'intervento di un numero elevato di "colli di bottiglia", che agiscono contrastando

la variabilità della popolazione virale. Allo stato attuale della conoscenza non vi sono che deboli evidenze della possibilità che una certa selezione positiva agisca nei confronti della linea evolutiva che ha portato allo sviluppo di PCV2b e nei confronti dell'ORF3, una regione del genoma codificante per uno dei maggiori fattori di virulenza (Firth et al., 2009).

2.1.2. Caratteristiche fisico-chimiche

PCV2 è il più piccolo virus a DNA, autonomamente replicante, in grado di causare malattia nei mammiferi. Si tratta infatti di un virus a ssDNA circolare, a simmetria icosaedrica, privo di envelope, del diametro di soli $17 \pm 1,3$ nm. L'assenza di envelope lo rende resistente ai disinfettanti solventi dei lipidi come quelli a base di alcool, clorexidina, iodio e fenoli. Risulta invece sensibile ai disinfettanti alcalini, come l'idrossido di sodio, agli agenti ossidanti, quali l'ipoclorito di sodio, e ai sali di ammonio quaternario (Martin et al., 2008; Grau-Roma et al., 2010). L'efficacia di altri composti è stata dimostrata in condizioni sperimentali, tuttavia mancano studi adeguati a garantirne l'efficacia in condizioni di campo. L'uso di alte temperature si rivela efficace solamente a valori superiori ai 75°C protratti per oltre 15 minuti (Welch et al., 2006; O'Dea et al., 2008). Qualora il virus venga sottoposto a processi implicanti l'uso di calore asciutto la resistenza subisce un notevole incremento, venendo solo in parte inattivato da temperature di 120°C per 30 min (Welch et al., 2006). Analogamente, come desunto da dati inerenti a PCV1, sarebbe notevole la sopportazione a pH estremi, rimanendo stabile fino a pH3.

ORGANIZZAZIONE GENOMICA

PCV2 contiene una molecola di ssDNA circolare delle dimensioni di 1767-1768 basi. In esso sono state identificate tre principali ORF (open reading frame), ORF1-3. Altre ORF sono state individuate, tuttavia non vi è stato associato alcun significato nella patogenesi e la loro espressione non è stata dimostrata (Timmusk et al., 2006).

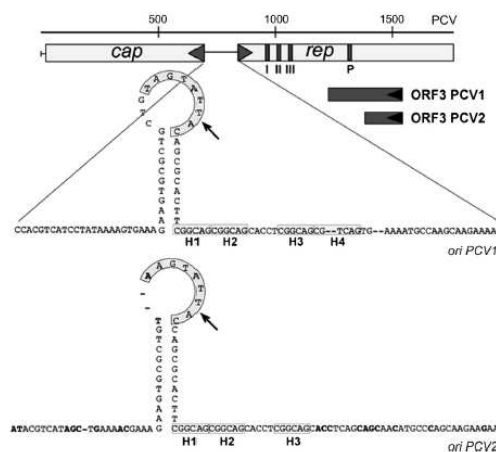


Fig. 2. Organizzazione genomica e origine di replicazione dei PCV.
 Tratto da Finsterbush et al., 2009

Il genoma risulta ambisenso essendo ORF1 e ORF2 orientati in modo divergente. Analogamente ORF3 è compresa nell'ORF1 ma viene trascritta in senso opposto. Questa organizzazione determina la presenza di due regioni intergeniche, una più corta fra il 3' di ORF1 e ORF2, e una seconda, di maggiori dimensioni fra le estremità 5'. Quest'ultima comprende l'origine di replicazione: una "stem-loop" costituita di una "inverted repeated" di 11 nucleotidi recante al suo apice un nonamero la cui sequenza risulta altamente conservata fra i Circovirus. Adiacenti alla "stem-loop" sono presenti tre esameri (H1-3) che servono, assieme alla sequenza palindromo prima citata, come sito di legame per le replicasi (fig. 2) (Finsterbush et al., 2009). Gli isolati sequenziati nei diversi paesi hanno rilevato un' omologia di sequenza maggiore del 96%; minore nel caso dell'ORF2 (93-100%) rispetto all'ORF1 (97-100%) (Larochelle et al., 2002). Tuttavia è necessario sottolineare come questi siano dati indicativi, sussistendo una certa variabilità fra quanto riportato dai diversi autori.

PROTEINE VIRALI

La componente proteica risulta estremamente essenziale, essendo rappresentata da solo tre tipologie di proteine. Queste sono in grado di adempiere non solo allo svolgimento dei processi fondamentali per la replicazione virale (la duplicazione del materiale genetico e il suo "packaging") ma anche di interferire in modo esteso con i vari processi di signalling dell'organismo.

Dalla trascrizione e splicing alternativo di ORF1 vengono tradotte due proteine, *Rep* e *Rep'* (rispettivamente di 314 e 178 aa), necessarie ai fini della replicazione del materiale genetico. *Rep* e *Rep'* si co-localizzano nel nucleoplasma della cellula infetta, dove avviene la duplicazione del patrimonio genetico, dipendente dalle DNA polimerasi cellulari. Ciò è reso possibile dalla presenza di tre segnali di localizzazione nucleare o Nuclear Localization Signals (NLS).

In aggiunta a questa funzione primaria si è potuta evidenziare la capacità interagire con altri costituenti cellulari, condizionando pathways anche non strettamente legati alla sintesi del DNA (tab. 2) (Timmusk et al., 2006; Finsterbush et al., 2009).

ORF2 codifica per la proteina strutturale *Cap* (233aa) che, assemblandosi in dodici unità pentameriche, costituisce il capsido virale. Come tale rappresenta il principale determinante antigenico. Si ritiene che le principali aree immunoreattive siano rappresentate dalle regioni 65-87, 113-147, 157-183 e 193-207 (Mahè et al., 2000) sebbene nuovamente sussistano lievi divergenze fra quanto riportato in diversi articoli. Ciò risulta particolarmente interessante considerando che fra queste sono comprese le aree di maggiore eterogeneità aminoacidica fra i

diversi isolati, facendo quindi presumere un ruolo della pressione selettiva imposta dalla risposta immunitaria sull'emergenza di nuove varianti (Timmusk et al., 2008; Opriessnig et al., 2006d).

La proteina capsidica svolge un ruolo fondamentale anche nei confronti del materiale genetico del *Circovirus*, contribuendo al suo packaging e probabilmente regolandone la sintesi. *Cap* presenta infatti l'estremità N-terminale ricca in arginina, facendo quindi presumere un ruolo primario nel legame con il DNA virale. Negli stadi iniziali dell'infezione si localizza a livello del nucleolo mentre più tardivamente la si può individuare nel nucleoplasma e nel citoplasma. È stato proposto che le proteine virali entrino nel nucleolo al fine di supportare la trascrizione virale o comunque influenzare il ciclo cellulare (Finsterbusch et al., 2009). La successiva co-localizzazione di *Rep* e *Cap* nel nucleo ha fatto avanzare l'ipotesi che la replicazione sia controllata dall'interazione fra queste proteine (Timmusk et al., 2006).

Oltre che con *Rep* e altre *Cap*, svariate sono le interazioni con diverse proteine cellulari (Timmusk et al. 2006; Finsterbusch et al. 2009). Queste sono brevemente riassunte nella tab. 3.

Particolare nota merita la ORF3, dal cui trascritto origina una proteina che sembrerebbe svolgere un ruolo primario nella patogenesi. Interessante in tal senso è rilevare la radicale differenza fra la ORF3 di PCV2 e quella di PCV1, considerato non patogeno. In primo luogo vi è una significativa discrepanza nelle dimensioni (315aa in PCV2, 612aa in PCV1), in secondo luogo l'omologia, nella regione condivisa fra i due, risulta bassa (pari al 61,5%). Localizzandosi sia a livello citoplasmatico che nucleare sarebbe in grado di interagire con alcune proteine implicate nei processi di apoptosi. Studi iniziali avevano evidenziato la capacità di indurre l'apoptosi tramite l'attivazione della caspasi-8 e conseguentemente della caspasi-3 (Liu et al., 2005). Successivamente i bersagli molecolari di ORF3 sono stati meglio caratterizzati. In particolare si è evidenziata l'interazione con il p53 binding domain di pPirh2, un'E3ubiquitina ligasi a localizzazione citoplasmatica e, in misura minore, nucleare (Liu et al., 2007). Compito di questa

| PROTEINA | FUNZIONE | POSSIBILE SIGNIFICATO |
|-----------|---|--|
| Syncoilin | Regolazione della distribuzione della desmina nei filamenti e nel citoplasma | Sequestro di <i>Rep</i> nel citoplasma (regolazione del ciclo virale) Trasporto nel nucleo di <i>Rep</i> e con questa del DNA virale |
| c-myc | Fattore di trascrizione | Attivazione di geni utili ai fini della replicazione del DNA virale Alterazione di diversi pathways cellulari, apoptosi inclusa Regola espressione di Nramp 1, implicato nella resistenza ai patogeni intracellulari |
| ZNF265 | Componente dello Spliceosoma | Influenza la trascrizione e lo splicing |
| VG5Q | Angiogenesi | Regolazione della trascrizione |
| TDG | Riparazione DNA, interazione con ER α (estrogen receptor α) e Thyroid transcription factor I | Regolazione della trascrizione |

Tab. 2. Proteine cellulari per le quali è stata descritta un'interazione con *Rep* e loro funzione.

proteina è quello di legare e promuovere l'ubiquitinizzazione, determinandone la degradazione, di p53, fattore di primaria importanza nell'induzione della morte cellulare programmata a seguito di danni cellulari. L'interferenza con l'attività di pPirh2 si manifesterebbe in diversi modi: (I) il legame con ORF3 potrebbe impedire quello con p53; (II) ORF3 diminuisce la concentrazione di pPirh2, probabilmente favorendone l'autoubiquitinizzazione e la degradazione da parte del proteasoma o alterandone la stabilità. In aggiunta si è potuto osservare come l'aumento dei livelli di p53 non siano attribuibili solamente ad una diminuzione della degradazione ma anche ad un aumento dei livelli di trascrizione e traduzione cui si associa altresì una maggiore attivazione fosforilazione dipendente. Studi in vivo (su topo) hanno confermato come virus deleti non inducano alcuna lesione o modificazione cellulare, pur rimanendo in grado di replicare e di indurre una più elevata risposta immunitaria (Liu et al., 2006). Attualmente non si attribuisce un ruolo nella replicazione virale né si ritiene che gli anticorpi indotti da ORF3 siano implicati nella risposta protettiva dell'ospite (Liu et al., 2005). Un'ulteriore interazione è stata rilevata nei confronti del fattore RGS16 (regulator of G-protein signalling 16), una proteina implicata nella regolazione del signalling mediato da recettori accoppiati a proteine G. In particolare per RGS16 è stata descritta una funzione inibitoria dell'azione di fattori di crescita verso i recettori per le chemochine (CXCR4). Inibirebbe inoltre i pathways dell' IL-8 e del RANTES mediati da CCR5 nei linfociti e influenzerebbe i fenomeni di chemiotassi linfocitaria (Timmusk et al., 2006). Tali fenomeni assieme all'induzione dell'apoptosi nelle cellule del sistema immunitario, depongono a favore di una marcata azione immunomodulatoria di PCV2. Concludendo, sebbene l'essenzialità morfologica potrebbe far pensare a un'equiparabile semplicità nella relazione con l'organismo

| PROTEINA | FUNZIONE | POSSIBILE SIGNIFICATO |
|-------------------------|--|--|
| P-selectina | Molecola di adesione cellulare | |
| C1qB | Fattore del complemento | Contributo a lesioni mediate da immunocomplessi Facilitare uptake di PCV2 da parte di fagociti |
| gC1qR | Recettore per C1qb | Recettore per diversi virus, promozione di trascrizione, replicazione, trasporto e assemblaggio Modula immunità innata (inibizione signalling antivirale) |
| MKRN1 | E3 ubiquitina ligasi | MKRN1 promuoverebbe degradazione di <i>Cap</i> |
| Hsp40 | Chaperone | Influenza la replicazione di diversi virus |
| Par-4 | Gene pro-apoptotico Mobilità cellulare Trasporto | Processazione o trasporto delle proteine virali |
| NAP1 | Trasporto e chaperone | |
| NPM1 | Trasporto Biogenesi dei ribosomi Chaperone | |
| DDE-like transposasi | Transposasi | |

Tab. 3. Proteine cellulari per le quali è stata descritta un'interazione con *Cap* e loro funzione.

ospite, la realtà si è rivelata essere ben più complessa. Lo studio delle diverse componenti ha permesso di evidenziare una complessa trama di interazioni con diverse proteine della cellula ospite. Questo rapporto determina una grande varietà di risposte che, dal livello cellulare, si ripercuotono nei diversi sistemi dell'organismo e nella loro interazione, esitando infine in una ampia varietà di quadri clinici, la cui patogenesi resta in molti casi oscura.

2.1.3. Ciclo di replicazione

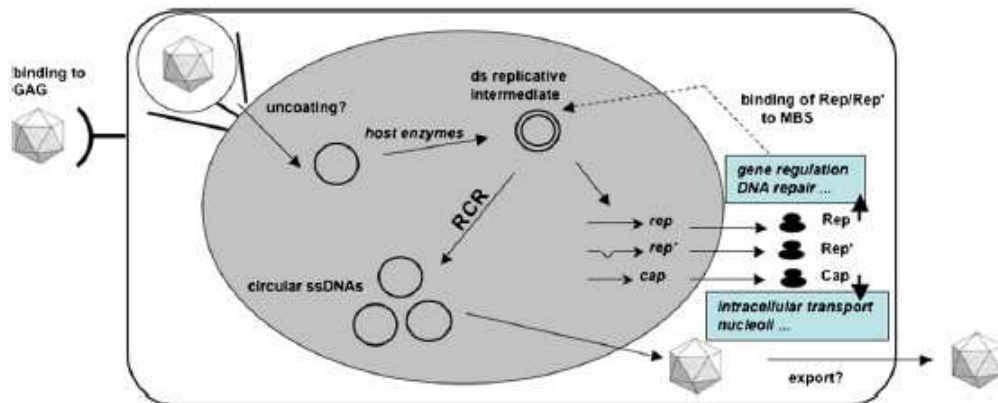


Fig. 3. Ciclo replicativi di PCV2. Tratto da Finsterbusch et al., 2009

Sebbene la presenza dell'antigene virale sia evidenziabile in diversi tessuti, la reale definizione delle cellule permissive alla replicazione virale risulta tuttora dibattuta. Per quanto concerne l'infezione in vitro questa è stata ottenuta in PK-15, monociti, cardiomiociti fetali, linee cellulari endoteliali e monocitarie suine, culture primarie di rene e fegato suino. Tuttavia la replicazione in senso proprio è stata confermata solo in linee cellulari (ad eccezione delle colture primarie di epatociti) le quali non riflettono in toto le caratteristiche delle cellule primarie (Steiner et al., 2008). In vivo la replicazione è stata dimostrata in cellule endoteliali aortiche, cellule epiteliali intestinali, fibrociti (Steiner et al., 2008), linfociti B e T, forse nei monociti nonché a livello renale, epatico, splenico e polmonare (Yu et al., 2007a). Tuttavia l'assenza della caratterizzazione cellulare in questi ultimi lascia presupporre un possibile ruolo anche della componente del sistema immunitario propria di questi organi. L'adsorbimento alla cellula avverrebbe attraverso la mediazione GAG quali l'eparina, l'eparansolfato e il condroitinsolfato B (Misinzio et al., 2006), probabilmente con la partecipazione di un altro co-recettore. Per quanto concerne l'endocitosi sono state proposte diverse modalità, variabili in funzione del tipo cellulare coinvolto, che tuttora necessitano di ulteriori approfondimenti. In particolare si sono evidenziate vie differenti per l'internalizzazione virale nelle cellule epiteliali rispetto alle cellule dendritiche e della linea monocitaria. In modo analogo l'interazione con i lisosomi presenterebbe caratteristiche diverse fra le due popolazioni cellulari (Misinzio et al., 2008; Misinzio et al., 2009).

Questa evidenza sommata all'opinione, significativamente condivisa, che monociti e cellule dendritiche non sostengano la replicazione di PCV2 fa ritenere che la via caratteristica di questa popolazione non sia compatibile con il completamento del ciclo virale. Dopo l'ingresso del virus nel citoplasma la replicazione coinvolge diversi organuli. Sebbene il nucleo svolga un ruolo prioritario, l'associazione riscontrata al ME fra PCV2 e i mitocondri ne lascia supporre un qualche ruolo. Affinché il ciclo virale possa procedere, data la totale dipendenza dall'apparato replicativo cellulare, è necessario che la cellula sia proliferante ed in particolare nella fase S del ciclo (Gillespie et al., 2009). Il genoma virale può quindi essere convertito nella forma replicativa dsDNA che servirà da "stampo" per le successive fasi. Segue la trascrizione e traduzione dell' mRNA di *Rep* e *Rep'* e *Cap* e la successiva traslocazione nel nucleo. Il legame *Rep* e *Rep'* all'origine di replicazione destabilizza il dsDNA e induce l'esposizione del nonamero nella forma ssDNA che viene clivata dalle medesime proteine, rendendo quindi possibile la replicazione (fig. 3) (Finsterbusch et al., 2009). Alla fine della fase nucleare di replicazione le Virus Like Particles (VLP) si vanno progressivamente accumulando alla periferia del nucleo associate ad un network proteico che potrebbe contribuire all'assemblaggio del

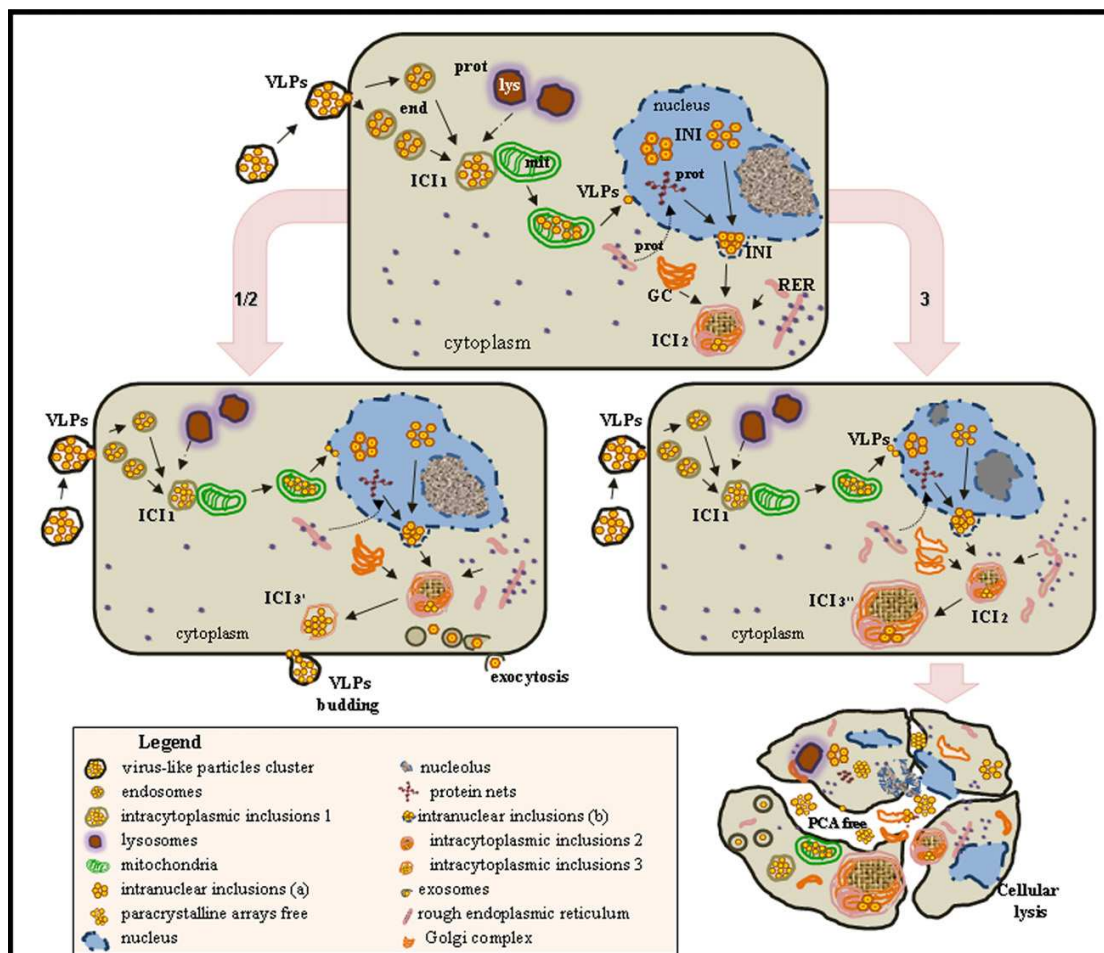


Fig. 4. Aspetti morfogenetici del ciclo replicativi di PCV2. Tratto da Rodriguez-Carino et al., 2010

virione, venendo in seguito rilasciate nel citoplasma tramite budding. All'interno del citoplasma si riscontrano delle Virus Factorys (VFs) che, a differenza dei corpi inclusi nucleari (evidenziabili al ME), risultano circondate da doppie o triple membrane. Risulta quindi probabile la partecipazione di altri organuli, quali il RER e il Golgi, al processo di assemblaggio, maturazione e trasporto. Le modalità di liberazione di PCV2 non sono state completamente delucidate e sussistono diverse ipotesi. Cluster di particelle virali potrebbero comportarsi come un'unica unità, passare dagli organuli al citoplasma e venir rilasciati tramite budding della membrana plasmatica (Rodriguez-Carino et al., 2010). Nel medesimo studio l'esocitosi delle singole particelle virali o la liberazione a seguito di citolisi sono state considerate meccanismi plausibili (fig. 4). Infine l'induzione dell'apoptosi può essere considerata come un mezzo per permettere la disseminazione della progenie virale alle cellule contigue minimizzando l'infiammazione ed evadendo la risposta immunitaria (Karuppanan et al., 2011).

2.2. PATOGENESI

Come più volte accennato la conoscenza attualmente disponibile circa la patogenesi della PCVD sono limitate e incomplete. La variabilità dei fattori implicati, i loro diversi pesi specifici e la difficoltà di controllarli nelle diverse condizioni sperimentali spesso determina la presenza di risultati contrastanti nei diversi studi. Le varie manifestazioni (o la loro assenza) sono frutto della relazione fra diversi elementi. Lo stato virale, la presenza di coinfezioni, i fattori ambientali e manageriali, le condizioni dell'ospite (quali l'età, la razza, lo stato immunitario) e la via di infezione non sono che alcune delle componenti che entrano in gioco. Ciò permette di intuire le ragioni delle diverse modalità con cui la patologia può presentarsi, da forme sistemiche a forme primariamente localizzate a determinati apparati, senza per questo dimenticare che la maggior parte delle infezioni decorre in forma subclinica. Per brevità di esposizione verranno ora presi in considerazione i caratteri generali dell'interazione virus-ospite, rimandando ai capitoli successivi la descrizione dei singoli quadri sintomatologici e anatomopatologici.

2.2.1. Suinetti

I giovani animali si infettano nelle prime settimane di vita, principalmente per via oro-nasale. Il periodo di incubazione, osservato in condizioni sperimentali, è di 2-4 settimane ma la viremia è spesso osservabile già 7-14 gg post inoculazione. In condizioni di campo questa, pur potendo essere già presente nel periodo pre-svezzamento, tipicamente incrementa parallelamente al declino del titolo anticorpale di origine materna, a partire dalle 4-6 settimane, evidenziando un ruolo almeno in parte protettivo di tale componente. In modo analogo la sintomatologia clinica, quando presente, interessa prevalentemente il periodo compreso fra le 7 e 16 settimane di vita

(Gillespie et al., 2009). Una volta penetrato nell'organismo PCV2 è in grado di interagire con diversi tipi cellulari. I principali siti di replicazione primaria sarebbero rappresentati dalle tonsille, dall'epitelio delle vie respiratorie e digerenti e da elementi del sistema immunitario. Cellule dendritiche e macrofagi, compresi quelli alveolari, svolgerebbero un ruolo di primaria importanza nella successiva disseminazione del patogeno. Queste cellule sono in grado di internalizzare il virus in modo massivo tramite endocitosi clatrina-mediata; un pathway che pare non essere compatibile con la replicazione virale. Tuttavia ciò che appare più interessante è la constatazione (Gilpin et al., 2003; Vincent et al., 2003; Chang et al., 2006) che PCV2 è in grado di rimanere associato a queste cellule per periodi prolungati, almeno fino a 5 giorni, senza perdere di infettività. Considerando il ruolo di *Antigen Presenting Cell* è facile supporre come questi possano veicolare PCV2 quantomeno ai linfonodi afferenti. Qui avverrebbe la prima importante fase di replicazione virale a cui seguirebbe la diffusione sistemica. Con maggior frequenza in queste sedi si possono riscontrare le caratteristiche lesioni, anche in presenza di forme asintomatiche o a carattere più localizzato. Infine si ritiene che queste sedi possano essere implicate nella persistenza del patogeno. Sebbene l'IHC raramente evidenzi l'associazione fra la componente linfocitaria e virale, la replicazione nei linfociti T e B è stata dimostrata (Yu et al., 2007a) sia a livello linfonodale che ematico. È sostanzialmente associato che l'attivazione linfocitaria svolge un ruolo fondamentale nel determinare alti tassi di replicazione virale. La fase viremica, prevalentemente cellulo-associata (Pensaert et al., 2004), è sostenuta dai monociti e linfociti circolanti. Vengono così raggiunti i diversi siti di replicazione, rappresentati principalmente dai tessuti linfatici, fegato, rene, intestino e milza. Ciò si accompagna alla comparsa delle lesioni tissutali, coinvolgenti preminentemente (ma non solo) il sistema immunitario, e delle alterazioni della formula leucocitaria. Appare rilevante sottolineare la correlazione positiva, dimostrata da più autori, fra i titoli virali a livello ematico (Brunborg et al., 2004; Segalés et al., 2005b) o tissutale (Krakowka et al., 2005) e la gravità delle lesioni anatomo-patologiche, delle alterazioni ematiche e della sintomatologia clinica.

PCV2 ha la capacità di causare infezioni persistenti, essendo spesso riscontrate viremie per un periodo superiore alle 22 settimane (Madson et al., 2009b) dopo infezione naturale. In condizioni sperimentali il DNA virale è stato riscontrato fino a 125 giorni post infezione nei tessuti (milza e ileo) e per un periodo di massimo 181 giorni in circolo (Patterson et al., 2011). È rilevante osservare come tale riscontro possa essere presente anche in presenza di elevati titoli anticorpali. L'escrezione si accompagna o addirittura precede la viremia e può perdurare, almeno in modo intermittente, per tutta la durata di quest'ultima ed anche oltre (Madson et al., 2009a).

FATTORI PATOGENETICI

Il coinvolgimento del sistema immunitario nella patogenesi delle PCVD appare centrale. I principali elementi a conferma sono rappresentati dalle estese lesioni al sistema linfoide, dalle ripercussioni sul pool leucocitario circolante e dalle frequenti associazioni con infezioni opportunistiche.

A livello ematico è possibile riscontrare, in particolare nei suini affetti da PMWS, una diminuzione nei $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+/8^+$ (doppi positivi) nonché nei linfociti B IgM^+ . Parallelamente si assiste ad un contrapposto aumento della componente monocitaria e granulocitaria, in particolare degli elementi immaturi (neutrofili a banda), comportante un'inversione del rapporto linfociti/neutrofili (Segalés et al., 2001; Darwich et al., 2004). Sebbene lesioni siano riscontrabili in diversi organi, la componente linfatica presenta senza dubbio il quadro più caratteristico. La deplezione linfocitaria delle aree follicolari ed interfollicolari, associata ad un infiltrato infiammatorio granulomatoso, rappresenta la lesione più peculiare. Anche in questo caso è possibile riscontrare una diminuzione dei linfociti B e T, in particolare $CD4^+$, nonché delle cellule dendritiche follicolari e interdiganti (Darwich et al., 2002). Sebbene molti studi siano stati fatti, permangono dubbi in merito alle modalità con cui PCV2 determina la comparsa di tale quadro. Le ipotesi proposte sono molteplici: l'induzione dell'apoptosi (Liu et al., 2005; Liu et al., 2006; Liu et al., 2007), l'inibizione della proliferazione a livello del midollo osseo, degli organi linfatici primari e/o secondari (Opriessnig et al., 2007b) o alterazioni nei fenomeni di homing (Darwich et al., 2002). Sebbene l'apoptosi sia stata a lungo invocata come uno dei principali meccanismi, anche grazie a una raffinata caratterizzazione dei pathways che sarebbero implicati, altri studi tendono a metterne in discussione il ruolo o quantomeno a ridimensionarlo (Resendes et al., 2004; Mandrioli et al., 2004; Steiner et al., 2008). Il dibattito attorno a questa tematica è tuttavia molto acceso e lungi dall'essere risolto. Un recentissimo articolo (Karuppanan et al., 2011) ha nuovamente riportato in auge il ruolo dell'ORF3. L'induzione dell'apoptosi, determinando la fagocitosi dei corpi apoptotici da parte dei macrofagi e di altre cellule ad attività fagocitaria, faciliterebbe la disseminazione sistemica del patogeno. In aggiunta contribuirebbe ad incrementare la secrezione di $IFN-\alpha$ (e probabilmente altre citochine) da parte di queste cellule. Sempre maggior peso viene attribuito dalla recente letteratura all'interferenza con le diverse vie di signaling intra- e intercellulare. Questa visione permette di evidenziare un ulteriore meccanismo patogenetico che non solo non esclude ma anzi può sostanziare le precedenti ipotesi, spiegando nel contempo la grande variabilità degli esiti conseguenti all'infezione da PCV2. Importanti alterazioni sono state riscontrate nei livelli di espressione di diverse citochine. IL-10 risulta sovra-espresso a livello

timico, proporzionalmente ai livelli di deplezione e atrofia dell'organo. Nei restanti tessuti linfoidi è sostanzialmente possibile osservare, rispetto ad animali clinicamente sani, una diminuzione nell'espressione di IL-2, IL-4, IL12p40, INF- γ (Darwich et al., 2003b; Darwich et al., 2004; Shi et al., 2010; Doster et al., 2010) (Tab. 4).

| Mediatore | Linfonodo | Milza | Tonsilla | Timo |
|--------------|-----------|-------|----------|------|
| IL-12 | < | < | > | |
| IFN γ | < | | | |
| IL-10 | >0< | | | > |
| IL-2 | < | < | | |
| IL-4 | < | | < | |

Tab. 4. Alterazione nell'espressione delle principali citochine nei tessuti linfoidi

Studi in vitro eseguiti su PMBC hanno altresì evidenziato una differente produzione di questi mediatori in risposta all'esposizione a mitogeni e soprattutto a una nuova esposizione a PCV2. In particolare è stata riscontrata una diminuzione della capacità di secernere IFN- γ , IL-2 e IL-4 parallelamente ad un incremento nella secrezione di IL-10 (Darwich et al., 2003a; Shi et al., 2010). Traendo le conclusioni è possibile notare una diminuzione delle citochine Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ), e Th2 (IL-4 e IL-6), implicate rispettivamente nell'immunità cellulo-mediata e umorale. Ciò riveste un ruolo cardine nel determinare l'immunosoppressione, causando una minor risposta anticorpale, una più elevata e duratura viremia e un aggravamento della sintomatologia clinica (Shi et al. 2010).

L'IL-10 ha un importante funzione immunosoppressiva in grado di contrastare la clearance virale (Doster et al., 2010). A sua volta l'IL-10 inibisce la produzione IFN- γ , IFN- α , IL-4 e IL-2. È stata inoltre dimostrata la correlazione fra i livelli di espressione a livello timico (e forse linfonodale) e il grado di deplezione linfocitaria (Darwich et al., 2003b). L'IFN- γ svolge un ruolo primario nel controllo delle infezioni virali ed è un importante mediatore della risposta immunitaria specie cellulo mediata. In aggiunta si è riscontrata la capacità di PCV2 di inibire la secrezione IFN α/β da parte delle Plasmocitoid Dendritic Cell, particolarmente responsive alla presenza di PAMPs virali e fondamentali per la maturazione delle Conventional Dendritic Cell (cellule presentanti l'antigene) (McCullough et al., 2009). In tal senso significativo risulta il riscontro della diminuzione dei livelli di MHC-II (Mandrioli et al.2004) e della capacità microbica (Chang et al., 2006) anche nei macrofagi infetti. L'insieme di questi elementi permette di giustificare la scarsa attivazione e proliferazione linfocitaria. Riassumendo, secondo diversi autori la deplezione linfocitaria sarebbe quindi da attribuirsi a una diminuita proliferazione a livello degli organi linfatici primari e secondari causata dalla diminuzione protratta nella produzione di fattori di crescita (per lo più citochine) (Boyman et al., 2007) associata alla contemporanea sovra espressione di fattori ad azione inibitoria, il tutto

possibilmente associato ad alterazioni nei meccanismi di homing. È infatti rilevabile una diminuzione dei livelli di espressione del Factor VIII-related antigen a livello delle venule a endotelio alto (Kekarainen et al., 2010).

Tuttavia l'azione di PCV2 non si esplica solamente in senso inibitorio. L'espressione di IL-8 e IL-1 β risulta stimolata in diversi distretti del sistema linfatico nonché nei PMBC dopo riesposizione all'antigene (Darwich et al., 2003a; Darwich et al., 2003b). Successivi studi condotti sui macrofagi alveolari hanno evidenziato ulteriori variazioni (Chang et al., 2006). La significativa up-regulation di TNF- α , IL-8, AMCF-II, G-CSF e MCP-1 fornisce, assieme alle evidenze prima citate, una plausibile spiegazione per diverse alterazioni ematologiche ed istologiche che si possono riscontrare (tab. 5).

Risulta infatti ipotizzabile il ruolo di questi mediatori nel determinare, oltre alle tipiche lesioni granulomatose evidenziabili nei diversi distretti, anche le supposte alterazioni nei livelli di proliferazione midollare che sarebbero alla base di neutrofilia, monocitosi ed anemia (Chae et al., 2004; Darwich et al., 2004).

| Mediatore | Funzione |
|---------------|--|
| IL-1 β | mediatore pro-infiammatorio di fase acuta |
| TNF- α | mediatore pro-infiammatorio di fase acuta |
| IL-8 | chemiotassi neutrofilica |
| | adesione monociti all'endotelio sotto l'effetto di MCP-I |
| AMCF-II | chemiotassi neutrofilica |
| | attivazione e reclutamento PMN |
| G-CSF | stimola precursori dei PMN a proliferare |
| | reclutamento e attivazione dei PMN a livello locale |
| MCP-I | chemiotassi monocitica e altre cellule del sistema immunitario |
| MIP-I | chemiotassi monocitica, NK e altre cellule del sistema immunitario |

Tab. 5. Citochine per le quali è stata riscontrata un' up-regulation e loro funzione.

Sebbene PCV2 sia in grado di indurre alterazioni nel profilo citochinico sia in soggetti sani che malati, alcuni soggetti risultano in grado di contrastare l'entità e le conseguenze di tali variazioni in modo più efficace di altri, sfuggendo allo sviluppo della malattia. I fattori di rischio, cui più volte si è accennato, potrebbero mediare la loro azione proprio agendo sul sistema immunitario. Altri agenti patogeni, nonché l'interazione dei fattori manageriali e ambientali, sarebbero in grado da un lato favorire la replicazione virale, dall'altro di contribuire, anche tramite un'azione additiva o sinergica sull'espressione dei diversi mediatori, all'azione immunosoppressiva. La genetica potrebbe altresì svolgere un ruolo cardine in tal ambito; polimorfismi dei geni del complesso maggiore di istocompatibilità, del T-cell receptor e delle citochine sono già stati dimostrati rilevanti per altre infezioni virali ed il loro ruolo è stato ipotizzato anche per PCV2 (Darwich et al., 2004). Un recentissimo studio ha posto in evidenza un interessante

coinvolgimento di questo patogeno nell'alterazione della funzionalità endoteliale dei vasi sanguinei e linfatici. L'infezione di questi elementi ne determinerebbe un'attivazione con conseguente secrezione o esposizione sulla superficie di molecole ad attività pro-coagulante. Questo esiterebbe in uno stato di ipercoagulabilità ematica caratterizzato da un incremento dell'attività della trombina e dell'attivazione delle piastrine e da una conseguente diminuzione dei tempi di tromboplastina parziale attivata (aPTT), tempi di protrombina (PT) e tempi di ricalcificazione (RT). L'insieme di questi fattori può giustificare alcune lesioni anatomopatologiche sovente riscontrate quali la presenza di microtrombi, emorragie, vasculiti e aree di necrosi ischemica. In aggiunta la presenza di elevati livelli di trombina si è rivelata in grado di incrementare *in vitro*, probabilmente grazie alla sua attività a livello recettoriale, il carico virale in cellule endoteliali incubate con PCV2 (Marks et al., 2010).

In definitiva, pur non trascurando l'importanza degli altri meccanismi patogenetici, si può constatare una profonda interazione del patogeno con i vari elementi del sistema immunitario, interessando sia la risposta innata che quella acquisita, umorale e cellulare, in senso sia inibitorio che stimolatorio. È probabilmente agendo su questa componente che fattori diversi (virali, individuali, genetici, manageriali, ambientali, ecc.) cooperano nel determinismo della molteplicità dei quadri clinici riscontrabili.

2.2.2. Scrofe

L'azione di PCV2 nella scrofa risulta significativa essenzialmente per le conseguenze sulle capacità riproduttive e per il ruolo che questa può avere nella trasmissione orizzontale alla progenie. L'infezione, oltre che attraverso le vie già citate per i suinetti, può probabilmente avvenire anche attraverso la via venerea (Madson et al., 2009b). La successiva viremia, prevalentemente cellulo-associata, permette la diffusione dal circolo materno a quello placentare anche in presenza di una certa immunità umorale. Maggiormente protettiva sembrerebbe in tal senso lo sviluppo dell'immunità cellulo-mediata (Pensaert et al., 2004). La trasmissione in utero fra feti, pur con una bassa efficienza, sembra avvenire. Infatti, sebbene l'evidenza di soggetti infettatisi in periodi diversi di gravidanza risulterebbe giustificabile considerando che la viremia nella scrofa può protrarsi per tutta la gravidanza, è stato altresì riscontrato come alcuni feti siano andati incontro ad infezione successivamente al completamento della clearance virale (Madson et al., 2009b). Gli effetti sulla fisiologia e continuazione della gravidanza dipendono da quanti feti sono divenuti infetti, da quanto rapidamente avviene la diffusione in utero e dalla percentuale di feti che sopravvivono. Fra i diversi fattori probabilmente implicati nel determinare gli esiti dell'infezione lo stadio di gestazione sembra svolgere un ruolo preminente. La gravità delle lesioni macroscopiche e la quantità di antigene virale risultano significativamente maggiori in

soggetti inoculati sperimentalmente a 57gg rispetto a quelli infettati a 75 e 92gg di gravidanza (Sanchez et al., 2001). Con il procedere dello sviluppo si osserva un progressivo mutamento della popolazione cellulare target. Durante la vita fetale i cardiomiociti (e solo in minor misura epatociti e macrofagi) rappresentano il principale sito di replicazione virale, giustificando in massima parte l'esito infausto dell'infezione e il quadro anatomopatologico riscontrato. La capacità di sostenere la replicazione virale, in modo analogo a quanto avviene per il Canine parvovirus 2, viene gradualmente persa come conseguenza del completarsi della differenziazione cellulare e della cessazione della capacità mitotica di queste cellule. Parallelamente maggiore importanza assumono gli elementi del sistema linfatico, determinando il caratterizzarsi di un quadro in continuità con quello tipico della vita post-natale (Sanchez et al., 2003; Park et al., 2005). Altro elemento di enorme rilievo è lo sviluppo dell'immunocompetenza, indicativamente al settantesimo giorno di gestazione. Infezioni prima di questa data impediscono il riconoscimento di PCV2 come non-self, determinando l'incapacità di montare una risposta immunitaria che ostacoli la replicazione virale. Ciò può evidentemente contribuire a spiegare i più elevati titoli virali riscontrati (Sanchez et al., 2001), le maggiori conseguenze cliniche, nonché la nascita di soggetti persistentemente infetti, sieronegativi sebbene viremici. È tuttavia necessario sottolineare che lo sviluppo del sistema immunitario non risulta protettivo in senso assoluto. Non è evenienza rara riscontrare soggetti contestualmente viremici e sieropositivi (Madson et al., 2009b). Sussistono inoltre suggestivi indizi della capacità di PCV2 di causare morte fetale anche in soggetti già immunocompetenti (Pensaert et al., 2004).

Durante la fase viremica i monociti circolanti sarebbero inoltre in grado di raggiungere il tessuto mammario, infettare la popolazione macrofagica residente e permettere l'escrezione virale nel colostro e successivamente nel latte, sia in forma cellulo-associata che libero (Park et al., 2009).

Un ultimo accenno deve essere riservato alla capacità del virus di aderire strettamente alle cellule del cumulo ooforo e alla zona pellucida (ZP) nonché di infettare l'embrione (qualora non sia protetto dalla ZP) già allo stadio di morula e con efficienza crescente al progredire dello sviluppo (Mateusen et al., 2004). Rilevante è anche la capacità di resistere ai comuni trattamenti riservati a oociti ed embrioni implicanti l'uso di lavaggi multipli, tripsina, ialuronidasi e DNasi/RNasi (Bielanski et al., 2004). Poiché nella fase viremica gli agenti virali possono venir escreti nel liquido follicolare e nelle secrezioni del tratto riproduttivo, il ruolo dell'embryo transfer nella trasmissione virale deve quantomeno essere considerato.

2.2.3. Verro

Nel caso del verro parlare di patogenesi è, in senso stretto, probabilmente improprio. Nella pratica l'elemento maggiormente degno di nota è rappresentato dall'escrezione virale nel seme,

peraltro senza che sia stata definitivamente provata l'efficacia di questa via di contagio. È stata infatti dimostrata l'infettività dei virioni escreti senza che tuttavia si sia riusciti a riprodurre l'infezione tramite inseminazione. Probabilmente ciò è da attribuirsi ai bassi titoli virali presenti nel seme (ulteriormente abbattuti nella pratica zootecnica dall'uso di extender) o delle particolari condizioni dell'ambiente uterino al momento dell'estro (Madson et al., 2009d).

La presenza virale nel seme segue generalmente la viremia di 4-14 gg e non è associata ad alterazioni nella morfologia e vitalità degli spermatozoi (Madson et al., 2008). Le caratteristiche dell'escrezione virale sono estremamente variabili essendo stata descritta come continua (Madson et al., 2008) o intermittente (Larochelle et al., 2000; McIntosh et al., 2006) per periodi di tempo diversi, anche in presenza di anticorpi circolanti. McIntosh ne ha rilevato la presenza fino a 27,3 settimane, in soggetti di età compresa fra le 33,9 e 149,3 settimane. Anche la localizzazione risulta dibattuta. Sebbene i diversi autori concordino nella presenza di una certa quota di virioni in tutte le componenti del liquido seminale, Pal et al., 2008 hanno rilevato una maggiore concentrazione a livello della frazione cellulare mentre Kim et al., 2003d avevano evidenziato il ruolo preminente del plasma seminale e della componente cellulare non spermatica. La presenza di DNA virale è stata dimostrata a livello dei testicoli, dell'epididimo e delle ghiandole sessuali accessorie (Madson et al., 2008). In quest'ultime, in macrofagi e cellule fibroblasto-simile, è stato altresì possibile identificare la presenza dell'antigene tramite metodiche di immunoistochimica (Opriessnig et al., 2006b).

2.3. IMMUNITÀ

L'interazione fra il patogeno ed i diversi costituenti del sistema immunitario è molto complessa e recita sicuramente un ruolo primario nel determinare lo sviluppo delle PCVD e di eventuali complicanze secondarie. In termini generali la risposta immunitaria dell'individuo può risultare protettiva nei confronti di PCV2 limitando l'entità dell'infezione e prevenendo la comparsa di sintomatologia clinica. Tuttavia le diverse componenti del sistema immunitario, considerate singolarmente, paiono fornire una protezione solo parziale, risultando quindi necessaria, con tutta probabilità una piena collaborazione fra queste ai fini di una proficua risposta. Le reali motivazioni alla base dell'evidenza per cui la reattività immunitaria si traduca a volte nella clearance virale e a volte in un fattore patogenetico, esitante peraltro in una condizione di immunosoppressione, rimangono sotto molti punti di vista oscure.

2.3.1. Immunità umorale

In condizioni sperimentali si è osservato lo sviluppo di una risposta anticorpale fra i 10 e i 28 giorni post-infezione, indipendentemente dallo sviluppo o meno di una sintomatologia clinica

(Kekarainen et al., 2010). Tuttavia altri studi hanno evidenziato una sierconversione più tardiva o caratterizzata da titoli meno elevati nei soggetti che svilupperanno sintomatologia clinica (Meerts et al., 2006; Grau-Roma et al., 2009; Brunborg et al., 2010).

Cap è considerata la proteina più immunogena e, oltre a quelli prima citati, sono stati identificati quattro epitopi conformazionali neutralizzanti: 156-162 e 175-192, condivisi con PCV1; 195-202; 231-233, propri solo di PCV2 (Kekarainen et al., 2010). Il ruolo di *Rep* non è stato studiato in modo altrettanto esteso. Si è potuto egualmente evidenziare come la risposta anticorpale interessi anche *Rep* e *Rep'*, pur risultando più tardiva e meno marcata della precedente (Fort et al., 2010). Come prevedibile le IgM rappresentano la prima classe anticorpale a comparire, essendo riscontrabili già 10gg post-infezione e raggiungendo il picco a 21gg. Nei soggetti affetti da PMWS tale componente risulta inferiore ed il declino dei titoli è significativamente più celere di quanto non avvenga nei soggetti subclinici. Lo switch isotipico avviene in entrambe le categorie fra 14 e 21 gg post infezione sebbene nei soggetti malati (e con livelli di viremia maggiori) si riscontrino nuovamente titoli inferiori (Meerts et al., 2006; Kekarainen et al., 2010).

Il maggior discriminante appare tuttavia essere rappresentato dal titolo di anticorpi neutralizzanti. Questi, rappresentati per lo più da IgG e in minor misura IgM, legando il virus sono in grado di prevenire un'ulteriore diffusione nell'organismo inibendo l'infezione di nuove cellule. Nel caso di PCV2 tale risposta può essere considerata di per se debole, rilevabile, almeno inizialmente, solo con metodiche di sieroneutralizzazione particolarmente sensibili, a partire da 7-14 gg post infezione (Meerts et al., 2006; Fort et al., 2007). Nei soggetti sani segue un progressivo incremento, secondo dinamiche assimilabili a quelle del titolo anticorpale complessivo. I lunghi tempi di induzione di detta componente permettono almeno in parte di giustificare il protratto periodo di viremia che normalmente caratterizza l'infezione. Concordemente, il loro incremento coincide generalmente con una diminuzione della carica virale. I soggetti malati o comunque con alti livelli di replicazione virale sono risultati presentare livelli estremamente bassi o nulli di anticorpi neutralizzanti. Sulle cause alla base di questo fenomeno le conoscenze sono scarse. È stata proposta l'incapacità degli animali di riconoscere gli epitopi implicati nella neutralizzazione del virus. Una delle ipotesi in tal senso è inerente all'influenza della genetica sul sistema immunitario. L'altra spiegazione, non necessariamente in contrasto con la precedente, è rappresentata dall'azione del virus stesso. È stato infatti più volte ribadito come PCV2 sia in grado di intervenire in senso quali-quantitativo con il sistema immunitario e non sorprende quindi come anche tale aspetto possa risultare deficitario (Darwich et al., 2001; Meerts et al., 2006; Liu et al., 2006). La presenza in alcuni soggetti viremici di

livelli di anticorpi neutralizzanti significativi fa supporre che anche questi di per se stessi possano risultare insufficienti a una completa clearance virale (Fort et al., 2007).

Il ruolo dell'immunità locale è meno studiato. Tuttavia le IgA, riscontrabili a partire dai 7gg post-infezione, sembrano svolgere un ruolo fondamentale nel controllare la replicazione virale nelle prime fasi dell'infezione, sia essa a livello del tratto respiratorio che digerente (Yu et al., 2007a; Gerber et al., 2011).

2.3.2. Immunità cellulo-mediata

Gli anticorpi neutralizzanti possono esplicare la loro azione solo nei confronti di antigeni extracellulari o presenti sulla superficie cellulare. Tuttavia PCV2, come gli altri virus, prevede un ciclo replicativo intracellulare ed essendo sprovvisto di envelope, è improbabile (ad oggi non vi sono prove in tal senso) che le sue proteine vengano espresse sulla superficie cellulare. Conseguentemente altri meccanismi di citotossicità devono essere implicati nel contrastare la fase intracellulare del ciclo virale.

Le conoscenze riguardo l'immunità cellulo-mediata sono scarse, ed incentrate principalmente sullo studio delle dinamiche di sviluppo di INF γ secreting cell (INF γ SC) specifiche per PCV2 (Fort et al., 2009; Steiner et al., 2009; Fort et al., 2010). INF γ è considerata una delle citochine chiave nello sviluppo di questo tipo di immunità, in particolare stimolando la differenziazione dei linfociti CD4 in Th1. Sperimentalmente, PBMC ottenuti da animali infettati con PCV2 sono stati riesposti all'antigene onde misurare la secrezione di INF γ e sondare quindi l'avvenuta formazione di INF γ SC specifiche. Lo sviluppo di questi elementi è stata riscontrata a 21 gg post-infezione (Steiner et al., 2009); analoghi risultati sono stati ottenuti da Fort (2009) il quale colloca la comparsa di INF γ SC PCV2 specifiche fra i 14 e 21gg. PCV2 è quindi in grado di indurre la formazione di linfociti T specifici sebbene si ritenga che non rappresenti un forte immunogeno per le cellule T, probabilmente a causa della sua lenta replicazione. L'uso di anticorpi monoclonali anti-CD4 e anti-CD8 ha permesso di evidenziare, come poi confermato da studi di citometria di flusso, il contributo dei linfociti T sia citotossici che helper nella secrezione di INF γ (Steiner et al., 2009). È altresì unanime il riscontro di una correlazione negativa fra lo sviluppo e l'intensità della risposta cellulare ed i livelli di replicazione virale nei suini infetti.

Per quanto concerne i target molecolari recenti studi hanno evidenziato come siano coinvolte sia proteine strutturali che non strutturali. Tuttavia sono riscontrabili differenze significative nella comparsa e intensità della risposta nei confronti di *Cap* e *Rep*. Tutti gli animali infettati, anche quelli con viremie molto basse, sviluppano una risposta nei confronti di *Cap*, evidenziando come questo sia un buon immunogeno anche per i linfociti T. Considerando che PCV2 è in grado di infettare e persistere a lungo senza replicare nelle cellule dendritiche e della linea monocito-

macrofagica, l'induzione di un'immunità cellulo-mediata nei confronti di *Cap* sembra svolgere un ruolo cruciale nel contrastare la persistenza dell'infezione in queste cellule. Contrariamente, solo i suini che presentano un elevato titolo virale e la presenza di lesioni caratteristiche di PCV2 manifestano una significativa reazione nei confronti di *Rep*. Questa evidenza suggerisce che un certo livello di replicazione virale è necessario per stimolare la risposta nei confronti di tale proteina. Tale ipotesi appare plausibile considerando come questa venga espressa solamente nelle cellule che supportano la replicazione. È quindi lecito ipotizzare che l'immunità rivolta contro *Rep* possa essere importante nel limitare tale fenomeno e prevenire la progressione dell'infezione verso lo sviluppo di PCVD (Fort et al., 2010).

2.3.3. Immunità materna

I sopracitati dati inerenti il timing della sieroconversione, pur validi, considerano soggetti privi di immunità pregressa. Data la diffusione sostanzialmente ubiquitaria del virus la stragrande maggioranza delle scrofe risultano sieropositive e come tali in grado di trasmettere un'immunità passiva alla progenie, sostanzialmente tramite il colostro. L'emivita di tali anticorpi è stimata in 19 gg e conseguentemente i suinetti ridivengono sieronegativi indicativamente a $4,9 \pm 1,2$ settimane di età nei soggetti con bassi titoli anticorpali, a $8,1 \pm 1,9$ settimane in quelli con titoli moderati e $11 \pm 2,5$ in animali con elevata immunità passiva (Opriessnig et al., 2007b). La presenza di titoli elevati di IgA secrete nel colostro e in minor misura nel latte svolge, come già descritto per gli adulti, un ruolo importante nella protezione del tratto gastroenterico (e respiratorio) dei lattanti (Gerber et al., 2011). Diversi elementi portano a sostenere il ruolo quantomeno parzialmente protettivo dell'immunità di origine materna. Il riscontro che vi sia una relazione temporale fra la diminuzione dell'immunità materna e la comparsa di viremia con successiva sieroconversione (Larochelle et al., 2002; Grau-Roma et al., 2009) nonché l'evidenza che la sintomatologia clinica compaia tipicamente dopo le quattro settimane di vita apportano interessanti elementi di conferma. Vi è inoltre una significativa correlazione negativa fra titolo anticorpale post colostrale ed entità della viremia (McKeown et al., 2005; Opriessnig et al., 2010), lesioni (Opriessnig et al., 2010), casi di PMWS (Grau-Roma et al., 2009) e mortalità (Calsamiglia et al., 2007). Appare tuttavia importante sottolineare come, sia nel caso dell'immunità attiva che passiva, i diversi autori sopra-citati concordino nel sostenere che la protezione offerta non sia totale o comunque sia condizionata dalle caratteristiche quali-quantitative (in particolare in termini di titolo di anticorpi neutralizzanti) della stessa (Fort et al., 2007). L'infezione, la viremia e l'escrezione virale sono riscontrabili anche in soggetti sieropositivi pur con conseguenze generalmente meno rilevanti. Sebbene rappresenti più l'eccezione che la regola, Larochelle et al., (2002) riporta tuttavia gruppi di animali con analogo

titolo anticorpale ma differenti in termini di comparsa della sintomatologia clinica. Conseguentemente si ritiene che il pieno contributo sia della componente cellulare che umorale, nonché le caratteristiche di quest'ultima, sia necessario per una piena protezione.

Analoghe supposizioni sono state fatte in merito al ruolo dell'immunità nel prevenire la trasmissione verticale di PCV2. Dato il carattere cellulo-associato della viremia si è portati a ritenere che la diffusione trans-placentare possa non essere completamente impedita dalla componente anticorpale. Altri patogeni quali ADV e CSFV sono in grado di infettare i feti qualora la scrofa sia stata trattata con vaccini inattivati. Tale fenomeno non avviene (o avviene in misura molto minore) in soggetti immunizzati nei confronti del virus di campo o di ceppi vaccinali vivi attenuati. Risultati analoghi sono stati ottenuti con PCV2 (Madson et al., 2009c) lasciando supporre che, probabilmente, un più marcato sviluppo dell'immunità cellulo-mediata possa giocare, un ruolo base nel coadiuvare la componente umorale e contrastare la viremia cellulo-associata e le sue conseguenze (Pensaert et al., 2004).

In studi inerenti altri patogeni è stata dimostrata la presenza di linfociti T nel colostro suino ed il trasferimento dell'immunità antigene specifico T-cell dipendente sia attraverso il colostro che per via transplacentare. Tuttavia il ruolo di questa componente nel caso di PCV2 deve ancora essere indagato.

2.3.4. Immunosoppressione

L'immunodeficienza secondaria virus-indotta è un fenomeno ben conosciuto e riconducibile, nella specie suina, a diversi batteri e virus (Segalés et al., 2004a). Le evidenze di un'analogia azione di PCV2 sono molteplici. Fra i riscontri diretti è infatti possibile addurre le già citate alterazioni istologiche, ematologiche e funzionali dei diversi costituenti il sistema immunitario. In aggiunta non può essere trascurato il riscontro di un'elevata frequenza di coinfezioni comprendenti diversi microrganismi, alcuni dei quali classicamente considerati patogeni opportunisti e comunemente associati a stati di immunosoppressione nell'uomo e negli animali (Segalés et al., 2004a) (tab. 10). A ulteriore riprova una diminuzione dell'efficacia dei vaccini verso altri patogeni non può non essere considerata indicativa di una diminuzione della reattività dell'organismo verso antigeni estranei (Opriessnig et al., 2006c).

2.4. *SEGNI CLINICI, LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE E ISTOPATOLOGICHE*

L'infezione da PCV2 si può manifestare con una significativa varietà di sindromi (Segalés et al., 2004b), complessivamente definite PCVD, che differiscono primariamente per gli apparati coinvolti. Quali siano i reali determinanti che favoriscono lo sviluppo di un particolare quadro

resta tuttora oggetto di discussione, così come ancora discusso è il reale contributo del virus nella patogenesi di alcune delle sindromi che verranno descritte.

POST-WEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME (PMWS)

La malattia interessa primariamente i soggetti fra le 4-16 settimane ed è accompagnata da una mortalità approssimativamente del 10% (range 4-20%). I segni clinici comprendono inizialmente riduzione nel incremento ponderale, febbre, pallore e perdita di condizione del mantello. Seguono poi dispnea, tachipnea, diarrea scura, anemia e ittero, accompagnati da aumento di volume dei linfonodi.

Alla necropsia le lesioni più suggestive interessano i polmoni e i linfonodi. I primi appaiono non collassati, screziati sui toni del marrone-rossiccio. I secondi (in particolare quelli inguinali, sottomandibolari, mesenterici e mediastinici) appaiono aumentati di volume. Molto sporadicamente possono risultare atrofici. In un numero limitato di soggetti aree di necrosi da multifocali a coalescenti possono risultare visibili macroscopicamente. Il fegato può apparire aumentato o ridotto di volume, con colorazione giallo-aranciata in caso di ittero. I reni possono presentare foci multipli biancastri di diametro variabile. Un'elevata percentuale di soggetti presenta altresì consolidamento dei lobi polmonari cranio ventrali e ulcere gastriche della *pars esofagea* che usualmente sono associate ad infezioni batteriche (la prima) e di origine multifattoriale (la seconda) e non sono considerate un effetto diretto di PCV2. Le ulcerazioni sono spesso associate ad anemia, cui si associa il pallore cutaneo, anche se è possibile riscontrare animali anemici in assenza di tali lesioni. In particolare nei casi a decorso cronico è possibile riscontrare cachessia, atrofia delle masse muscolari e del tessuto adiposo (tab. 6).

| LESIONE MACROSCOPICA | % |
|---|------|
| Deperimento ^a | 80,3 |
| Polmoni che non collassato, screziati marrone rossiccio ^a | 64,4 |
| Consolidamento polmonare (brucopolmonite) | 59,3 |
| Aumento di volume di almeno un linfonodo (linfadenpatia) ^a | 52,8 |
| Ulcere gastriche nella <i>pars oesophagea</i> | 28,5 |
| Sierosite (mono-polisierosite) | 25,0 |
| Atrofia sierosa del grasso | 22,7 |
| Presenza di foci biancastri a livello renale ^a | 18,4 |
| Feci morbide a livello del retto (colite catarrale associata a diarrea) | 11,1 |
| Atrofia epatica ^a | 3,3 |
| Colite fibrino-necrotizzante | 3,3 |
| Ittero ^a | 2,3 |
| Necrosi linfonodale ^a | 2,3 |
| Polmonite necrotizzante | 2,0 |
| Epatomegalia | 0,5 |

Tab. 6. ^a reperto particolarmente suggestivo per PMWS. Tratto da Segalés et al. (2004b)

Le lesioni istologiche (tab. 7) dei tessuti linfatici rappresentano l'elemento più caratteristico. Si osservano vari gradi di deplezione linfocitaria, con perdita della struttura follicolare, associato a infiltrazione istiocitaria da multifocale a diffusa associata alla presenza di cellule giganti multinucleate. Caratteristica è la presenza di corpi inclusi citoplasmatici basofili, di aspetto sferico e ben demarcato nelle cellule istiocitarie. È altresì possibile riscontrare fenomeni di necrosi e apoptosi; in taluni casi a livello linfonodale si osservano estese aree di necrosi coagulativa multifocali coalescenti, associate a trombosi vascolari. A livello polmonare si riscontrano processi di polmonite interstiziale subacuta in presenza di infiltrato istiocitario e cellule giganti multinucleate all'interno degli alveoli e nei setti alveolari, che appaiono ispessiti. Nei casi cronici può essere presente una bronchiolite fibrosa obliterante. Lesioni analoghe a quelle riscontrabili a livello linfonodale sono riscontrabili in alcuni soggetti anche a livello del BALT. Le lesioni epatiche sono caratterizzate da un infiltrato linfo-istiocitario nelle zone periportal, degenerazione idropica, cariomegalia e necrosi random degli epatociti. In alcuni casi, tipicamente associati ad ittero e lesioni epatiche evidenziabili anche macroscopicamente, può essere presente un'estesa fibrosi perilobulare, disorganizzazione dei piatti degli epatociti ed una più estesa necrosi epatocitaria. La presenza di un infiltrato infiammatorio granulomatoso è riscontrabile anche in altri tessuti quali rene, cuore e intestino.

| LESIONE MICROSCOPICA | % |
|---|------|
| TESSUTO LINFOIDE | |
| Deplezione linfocitaria | 89,1 |
| Infiltrato infiammatorio istiocitario | 77,0 |
| Corpi inclusi intracellulari | 34,6 |
| Cellule giganti multinucleate | 28,5 |
| Necrosi coagulativa multifocale | 9,9 |
| POLMONI | |
| Polmonite interstiziale | 76,8 |
| Broncopolmonite catarral-purulenta ^a | 55,1 |
| Polmonite necrotizzante ^a | 4,0 |
| FEGATO (Rossel et al.,2000) | |
| Stage I | 33,1 |
| Stage II | 8,6 |
| Stage III | 2,0 |
| Stage IV | 1,3 |
| Totale | 45,0 |
| RENE | |
| Nefrite interstiziale | 37,6 |
| COLON | |
| Colite linfoplasmocitaria | 15,0 |
| Colite fibrino-necrotizzante ^a | 3,8 |

Tab. 7. ^a generalmente associate ad infezioni batteriche. Segalés et al.(2004b)

PORCINE DERMATITIS AND NEPHROPATHY SYNDROME (PDNS)

Questa sindrome interessa con maggior frequenza suini nella fase di ingrasso (pur essendo stata segnalata in soggetti di sole 5 settimane) e presenta generalmente esito infausto entro pochi giorni dalla comparsa della sintomatologia. Clinicamente si manifesta con un esordio improvviso di febbre, letargia e comparsa di lesioni cutanee violacee rilevate evolventi verso croste rossastre con centro nero. Queste corrispondono a infarti emorragici cutanei e sono localizzati

principalmente a livello degli arti posteriori e della regione perineale. Alla necropsia entrambi i reni appaiono aumentati di volume, pallidi e con petecchie disseminate a livello della corticale. È tuttavia importante ricordare come non tutti i soggetti presentino lesioni a livello renale e cutaneo. Raramente soggetti considerati affetti da PDNS non presentano lesioni a livello renale mentre altri presentano solo lievi lesioni a questo livello. Quest'ultimo caso viene classificato come "atipico" e viene egualmente ricondotto all'interno della sindrome in presenza di una vasculite necrotizzante sistemica. Le maggior alterazioni istopatologiche includono una glomerulonefrite fibrinosa e necrotizzante e, per l'appunto, una vasculite necrotizzante sistemica. Queste lesioni associate al riscontro di immunoglobuline e complemento nei vasi danneggiati e nei glomeruli suggeriscono una patogenesi di tipo immunomediato (ipersensibilità di III tipo). Sebbene gli antigeni potenzialmente responsabili di questa sindrome possano essere molteplici e sommare i rispettivi effetti (PRRSV, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* type 1 e 2, *Escherichia coli*, *Proteus* spp, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp) (Opriessnig et al., 2007b; Gillespie et al., 2009), l'associazione fra PCV2 e PDNS nonchè il ruolo di un'eccessiva risposta anticorpale contro questo patogeno sono stati evidenziati (Wellenberg et al., 2004).

Associate a queste caratteristiche lesioni si possono riscontrare anche deplezione linfocitaria ed infiltrato granulomatoso a livello linfonodale e polmonite interstiziale.

DISORDINI RIPRODUTTIVI

Alterazioni nelle performances riproduttive interessano principalmente scrofette e in generale animali sieronegativi. I segni clinici includono aumento dei fenomeni di morte embrionale e di ritorni in estro irregolari, morte fetale e mummificazione, aborti, natimortalità e mortalità pre-svezzamento. Negli animali abortiti o nati morti il cuore appare di aspetto globoso, aumentato di volume, con fenomeni di dilatazione evidenti in entrambi i ventricoli. Esternamente ed alla sezione di taglio sono riscontrabili striature biancastre interessanti il miocardio costituente la parete di entrambi i ventricoli ed il setto interventricolare. Associato a ciò si può osservare distensione addominale e versamenti sierofibrinosi in cavità peritoneale e pleurica, edema polmonare ed epatomegalia con pattern lobulare più evidente. Possono essere altresì presenti petecchie a livello splenico e atrofia timica. I feti mummificati talvolta presentano evidenze di distensione e versamento addominale, edema sierosanguineo sottocutaneo, epato- e cardiomegalia.

All'istologia si osservano aree di degenerazione e necrosi miocardica, talvolta accompagnata da mineralizzazione distrofica. Del connettivo fibroso poco organizzato, da scarso ad abbondante, rimpiazza i miocardiociti persi e, assieme all'edema presente, contribuisce a separarli. L'infiltrato linfocitario è generalmente lieve-moderato. Corpi inclusi basofili sono raramente riscontrabili nel citoplasma dei miocardiociti. A livello epatico si possono osservare fenomeni di apoptosi e necrosi coagulativa associata a congestione ed emorragie. Le guaine linfatiche periarteriose spleniche vanno incontro a deplezione linfocitaria e sostituzione di questa componente con macrofagi e rare cellule multinucleate. Analoghi fenomeni possono essere riscontrati a livello linfonodale (Brunborg et al., 2007, Madson et al., 2009b). A livello polmonare sono state segnalate polmoniti accompagnate da infiltrazione macrofagiaca nello spazio alveolare (Park et al., 2005).

PORCINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX (PRDC)

PRDC si presenta, generalmente fra le 8-26 settimane di vita (Opriessnig et al., 2007b), con crescita stentata, diminuzione dell'assunzione di alimento, diminuzione degli indici di conversione alimentare e segni clinici di polmonite quali febbre, tosse e dispnea. Diversi patogeni sono stati associati a questa sindrome fra cui i principali risultano PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tuttavia diversi altri agenti batterici e virali sono ritenuti implicati e fra questi anche PCV2. Sia macroscopicamente che microscopicamente le lesioni risultano significativamente variabili in funzione del tipo e numero di patogeni implicati. Inoltre le lesioni causate da PCV2 sono sostanzialmente indistinguibili macroscopicamente da quelle indotte da PRRSV e anche da alcune infezioni batteriche sistemiche. Anche microscopicamente il riscontro di polmonite bronco-interstiziale non permette una diagnosi certa. Tuttavia la presenza di esfoliazione dell'epitelio associata a fibroplasia mucosale e sub-mucosale ed infiltrato linfocitario diffuso a tutti i lobi del polmone sono considerati suggestivi di infezione da PCV2. Esiste inoltre una significativa sovrapposizione fra quadri di PRDC e PMWS e un cut-off netto risulta spesso difficilmente definibile.

PROLIFERATIVE AND NECROTISING PNEUMONIA (PNP)

Nell'eziologia di questa sindrome sono stati proposti nel tempo diversi agenti fra cui SIV, PRRSV e l'associazione fra PRRSV e PCV2. Clinicamente e macroscopicamente non differisce significativamente dalla sindrome prima descritta al punto che alcuni autori non prevedono una distinzione fra le due, riconducendo la PNP nella ambito del PRDC (Opriessnig et al., 2007b). La diagnosi di PNP si basa sostanzialmente sul quadro istologico, caratterizzato da cellule

necrotiche, macrofagi e materiale proteinaceo all'interno degli alveoli, proliferazione dei pneumoniti di tipo II e bronchiolite necrotizzante. Occasionalmente si evidenziano altresì cellule giganti multinucleate e membrane ialine nel lume alveolare ed inspessimento dei setti alveolari, infiltrati da cellule mononucleate.

PCV2 ASSOCIATED ENTERITIS

Casi di enterite associata a PCV2 si riscontrano prevalentemente in soggetti di 8-16 settimane di età e si manifesta clinicamente e macroscopicamente in modo simile all'ileite subacuta o cronica causata da *Lawsonia intracellularis*. Gli animali presentano diarrea, debolezza, diminuzione delle performances di crescita e aumento della mortalità. La mucosa intestinale risulta ispessita ed i linfonodi mesenterici appaiono aumentati di volume. All'istologia si riscontra un'enterite granulomatosa associata alle caratteristiche lesioni da PCV2 nelle placche del Peyer ma non in altri tessuti linfoidi (Opriessnig et al., 2007b).

EPIDERMITE ESSUDATIVA

L'epidermite essudativa è una forma specifica di piodermite, acuta, rapidamente progressiva e spesso fatale che si manifesta principalmente fra i 5 e 35 giorni di vita ma può comparire, sebbene in forme generalmente più lievi, anche più tardivamente. Nonostante l'agente causale sia *Staphylococcus hyicus* si ritiene che per la comparsa della patologia siano necessari dei fattori predisponenti. I risultati di alcuni studi indicano un'elevata prevalenza di PCV2 (e PPV) in animali affetti da epidermite essudativa. Significativamente i soggetti studiati presentavano un'alta percentuale di cellule PCV2-positive nelle lesioni cutanee mentre risultava bassa a livello dei tessuti linfoidi. PPV e PCV2 sono stati riportati come co-fattori per la piena espressione di questa sindrome in condizioni sperimentali ed è quindi probabile che possano avere un ruolo, anche in condizioni di campo, nello sviluppo o nella progressione delle lesioni. Queste si caratterizzano per la presenza di un essudato sieroso e sebaceo maleodorante che ricopre la superficie cutanea conferendogli un aspetto umido, sporco e unto. La morbilità varia fra il 10 e il 100% e la mortalità fra il 5 e il 90% (media 25%) (Chae, 2005).

CONGENITAL TREMOR (CT)

La presenza di tremori congeniti nel suino è associata a demielinizzazione a livello dell'encefalo o del midollo spinale. Le forme caratterizzate dalle lesioni istologicamente evidenziabili e ascrivibili ad un'eziologia virale ignota vengono classificate come AII. Gli animali colpiti si presentano con contrazioni cloniche di varia gravità che tendono a diminuire fino a risolversi

generalmente nel primo mese di vita. La letalità è indicativamente del 50% come conseguenza dell'impossibilità di alimentarsi. Allo stato attuale delle conoscenze il ruolo di PCV2 nella patogenesi di questa sintomatologia è assai controverso. Sebbene l'antigene e il DNA virale siano stati riscontrati nel tessuto nervoso di suini affetti, recenti studi non sono stati in grado di evidenziare alcuna correlazione fra i due eventi (Chae, 2005). Ciò nonostante la possibilità di infezione dell'endotelio a livello del CNS, il riscontro di ipertrofia epiteliale, vasculiti ed emorragie nonché lo stato di ipercoagulabilità ematica possono essere chiamate in causa a sostegno di un possibile ruolo di PCV2 nel determinare sintomatologia nervosa (Marks et al., 2010).

LINFADENITE NECROTIZZANTE

L'elemento maggiormente caratterizzante si rivela all'istologia ove è possibile riscontrare aree necrotiche primariamente al centro di prominenti follicoli linfatici. Le cellule necrotiche appaiono raggrinzite con nucleo picnotico o in carioressi. Ciò si manifesta in assenza della caratteristica reazione granulomatosa tipica della PMWS. È altresì possibile riscontrare la presenza di cellule apoptotiche. L'antigene o il DNA virale è rilevabile nelle cellule necrotiche e apoptotiche nonché nei macrofagi contigui (Chae, 2005). I soggetti spesso risultano asintomatici o presentano sintomatologia aspecifica. Alla necropsia le alterazioni sono limitate a uno due linfonodi (Opriessnig et al., 2007b).

FORME SUBCLINICHE

L'infezione da PCV2 sovente decorre in assenza di sintomi clinici e con lesioni assenti/lievi. Talvolta è possibile riscontrare forme di linfadenite necrotizzante limitata a uno o due linfonodi senza ripercussioni evidenziabili a livello sistemico (Opriessnig et al., 2007b).

Anche soggetti adulti, che molto raramente presentano sintomatologia, possono presentare lesioni comparabili qualitativamente a quelle precedentemente descritte sebbene in forma lieve. In sintesi sono stati riportati segni microscopici e talvolta macroscopici di polmonite interstiziale, linfadenopatia con deplezione linfocitaria e nefrite interstiziale (Madson et al., 2008).

3. EPIDEMIOLOGIA

3.1. SPETTRO D'OSPITE

L'infezione interessa gli appartenenti alla specie *Sus scrofa* rappresentati dal suino domestico e dal cinghiale. Ai fini sperimentali l'infezione è riproducibile e viene trasmessa anche nel topo. Sebbene report iniziali avessero suggerito che PCV2 potesse interessare anche il bovino e l'uomo successivi studi non hanno riscontrato alcuna evidenza di infezione produttiva in queste o in altre specie. Allo stato attuale delle conoscenze si ritiene quindi che specie diverse da quella suina (topo escluso) non siano suscettibili al virus e non abbiano alcun ruolo attivo nella sua epidemiologia (Grau-Roma et al., 2011; Puvanendiran et al., 2011). Per quanto concerne il ruolo del cinghiale appare opportuno spendere alcune parole. Diversi studi (Ellis et al., 2003; Vicente et al., 2004) hanno evidenziato la possibilità che questi animali non solo si infettino ma manifestino anche segni clinici di PMWS, sebbene ad un'età generalmente superiore a quella classicamente riscontrata nel suino domestico. Appare interessante notare come la sieroprevalenza sia correlata positivamente con la densità della popolazione animale e con forme di gestione più intensive nel caso degli allevamenti. Sebbene il cinghiale sia considerato un potenziale reservoir di diversi virus come la peste suina classica, la malattia di Aujeszky, la BVD e altri ancora, appare più probabile che la dinamica sia diametralmente opposta nel caso di PCV2 (Vicente et al., 2004). Tuttavia l'importanza epidemiologica in questa specie è tutt'ora oscura.

3.2. TRASMISSIONE VIRALE

3.2.1. Trasmissione orizzontale

La trasmissione orizzontale rappresenta la principale modalità di trasmissione di PCV2. Il virus è stato riscontrato, in studi diversi, in svariati secreti ed escreti sia tramite PCR sia tramite isolamento virale. In particolare l'escrezione avviene tramite i secreti nasali, bronchiali, tonsillari e oculari, nel colostro, nel latte e nel seme; PCV2 è inoltre riscontrabile nelle urine e nelle feci dei soggetti infetti (Segalés et al., 2005b; Grau-Roma et al., 2009; Grau-Roma et al., 2010; Patterson et al., 2011). L'eliminazione virale può presentare durata variabile; Patterson (2011) ha evidenziato una diffusione continua dai 28 ai 97 giorni di età seguita da un'eliminazione intermittente nei diversi secreti considerati fino a 209 gg. Tuttavia questo studio, pur evidenziando un'eliminazione di lunga durata, rappresenta un quadro molto parziale, considerando un numero limitato di soggetti, clinicamente sani e in condizioni sperimentali. Un ulteriore studio (Andraud et al., 2009) ha evidenziato come il tasso di trasmissione aumenti fra

gli 8 e 15 gg post infezione e diminuisca poi fino ai 55gg quando diviene irrilevante. Sebbene la fase di incremento possa essere giustificata da un aumento del carico virale la seconda fase, caratterizzata da una diminuzione dell'infettività, contrasta con i dati del precedente studio e soprattutto con il permanere di livelli di viremia elevati. In primis è rilevante osservare come vi sia una concomitanza fra la diminuzione del tasso di trasmissione e lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti ai quali si attribuisce, sebbene siano necessari ulteriori approfondimenti, l'abilità di limitare la capacità infettante del virus escreto. È inoltre importante ricordare come il riscontro del DNA virale non implichi la presenza di virioni infettanti e conseguentemente dal punto di vista biologico il riscontro del DNA per un certo lasso di tempo non implica che il soggetto rimanga infettivo per il medesimo periodo.

I titoli virali variano in funzione della via considerata e soprattutto dello stato sanitario del soggetto. Complessivamente i più alti titoli virali sono stati riscontrati a livello dei secreti tracheo-bronchiali, seguiti da quelli tonsillari e nasali ed infine da feci e urine. Nei soggetti affetti da PCVD l'eliminazione risulta significativamente maggiore rispetto ai soggetti clinicamente sani. Rilevante è l'evidenza che in soggetti privi di lesioni istologiche e negativi all'IHC ma positivi alla rt-PCR (tecnica dotata di maggior sensibilità) è stato possibile riscontrare, sebbene a bassi livelli, l'eliminazione virale (Segalés et al., 2005b).

TRASMISSIONE DIRETTA. Sebbene l'infezione possa essere diffusa, con diversa efficienza, attraverso varie vie, il contatto diretto appare senza dubbio quella più importante. L'ingresso per via oro-nasale avviene attraverso il contatto con le feci e le urine di animali del medesimo gruppo e tramite il contatto grugno a grugno fra suini del medesimo box o di box adiacenti (Gillespie et al., 2009). La trasmissione attraverso il contatto sessuale è stata più volte proposta ma permane tutt'ora molto dibattuta. Sebbene l'infettività dei virioni escreti nel seme sia stata dimostrata (Madson et al., 2009d) e l'utilizzo di materiale seminale contaminato sperimentalmente da PCV2 sia stato in grado di determinare infezione e malattia nelle scrofe (Madson et al., 2009b), il ruolo di questa via nelle condizioni di campo resta tutt'ora da stabilire (Grau-Roma et al., 2010). Ovviamente particolarmente stretto è il contatto implicito nelle cure parentali. In tale contesto oltre alle già citate vie di infezione deve essere presa in considerazione l'assunzione di colostro prima e latte poi. In entrambi i secreti è stata evidenziata la presenza di PCV2 (Shibata et al., 2006; Park et al., 2009) sebbene con frequenza maggiore nel colostro. Di interesse risulta il fatto che la diffusione attraverso questa via non risulta inibita dai titoli di anticorpi totali e neutralizzanti colostrali (Gerber et al., 2011) sebbene soggetti immunizzati (vaccinati) presentino una minor escrezione.

Più raramente l'infezione avviene senza un contatto fisico fra gli animali; questo può avvenire per via aerogena o per contatto indiretto (Dupont et al., 2009). Uno studio canadese (Verreault et al., 2010) ha riscontrato in isolatori di suini concentrazioni virali anche superiori a dieci milioni di virioni per metro cubo di aria, corrispondenti all'inalazione di circa 200TCID₅₀ (tissue culture infectious dose) al giorno. Sfortunatamente la concentrazione virale infettante per questa via di infezione non è stata specificatamente valutata nel suddetto studio e quindi non è possibile estrapolare predizioni sulle conseguenze sullo stato di salute degli animali. Inoltre non sussistono dati riguardo la trasmissione per via aerea a lunga distanza di PCV2. Tuttavia essendo stata dimostrata questa possibilità per altri virus, anche con caratteristiche fisiche meno favorevoli, questa evenienza è da ritenersi quantomeno plausibile.

TRASMISSIONE INDIRETTA La trasmissione indiretta si ritiene sia mediata principalmente dal personale e dallo strumentario usato (Dupont et al., 2009) sebbene anche gli insetti possano essere implicati. La *Musca domestica* è probabilmente l'insetto con il maggior potenziale di trasportare e trasmettere PCV2 a causa del numero elevato di individui e alla stretta associazione con i suini e i loro escreti (Blunt et al., 2011). Il ruolo degli scarafaggi, sebbene probabile, necessita invece di ulteriori studi.

Un ultimo aspetto degno di nota è la possibilità di infezione attraverso il consumo di tessuto muscolare, linfoide e midollo osseo non cotti proveniente da animali infetti (Opriessnig et al., 2009c). L'elevata resistenza termica di PCV2 ne rende inoltre plausibile la presenza anche in alimenti trattati, sebbene la veridicità di tale ipotesi e il ruolo epidemiologico necessitano ulteriori approfondimenti.

3.2.2. Trasmissione verticale

L'infezione trans-placentare così come gli effetti patogeni nei confronti del conceptus sono stati dimostrati. In aggiunta vi è la possibilità che PCV2 possa infettare i prodotti del concepimento anche veicolato da seme e ovuli infetti o come conseguenza dell'infezione delle vie genitali (Sarli et al., 2010). Tuttavia il ruolo di PCV2 nell'ambito della patologia riproduttiva rimane controverso: alcuni report suggeriscono si tratti di un evento raro mentre altri asseriscono che fino al 13% dei feti abortiti o dei natimorti sono infetti (Grau-Roma et al., 2010). Generalmente si ritiene che il potenziale patogeno per il feto sia basso in virtù del fatto che la stragrande maggioranza delle scrofe risultano sieropositive avendo già montato una risposta nei confronti del virus di campo, praticamente ubiquitario, o del vaccino. Un'eccezione può essere rappresentata da allevamenti di nuova formazione o dalla presenza di un'alta percentuale di scrofette sieronegative (Sanchez et al., 2001; Pensaert et al., 2004). Ciononostante i dati

attualmente disponibili sono scarsi e in continua evoluzione. Shen et al., (2010) hanno riportato una prevalenza di suinetti viremici pari al 39,9% pur considerando soggetti nati da scrofe prevalentemente sieropositive. Ovviamente risulta rilevante ai fini epidemiologici la nascita di soggetti viremici, talvolta persistentemente, potenziali fonti di infezione per gli altri soggetti della nidiata. La variabilità di dati in nostro possesso rendono tuttavia necessari ulteriori approfondimenti.

3.3. DISTRIBUZIONE

In considerazione delle molteplici dinamiche di trasmissione, delle caratteristiche virali e degli aspetti patogenetici risulta facile comprendere come PCV2 sia un agente ubiquitario, la cui presenza è stata riscontrata in tutti e cinque i continenti (Grau-Roma et al., 2010). La prevalenza è variabile e viene stimata fra il 40 e il 60% con picchi anche del 100% (Grierson et al., 2004; Shuai et al., 2007; Ramirez-Mendoza et al., 2009; Firth et al., 2009).

Sebbene sia stato dimostrato che la comparsa di PCV2 preceda di gran lunga la sua scoperta ciò non implica che il contesto epidemiologico sia rimasto immutato nel corso degli anni. Di interesse appare l'evidenza di un progressivo incremento della prevalenza riscontrato in diversi studi retrospettivi (fig. 5).

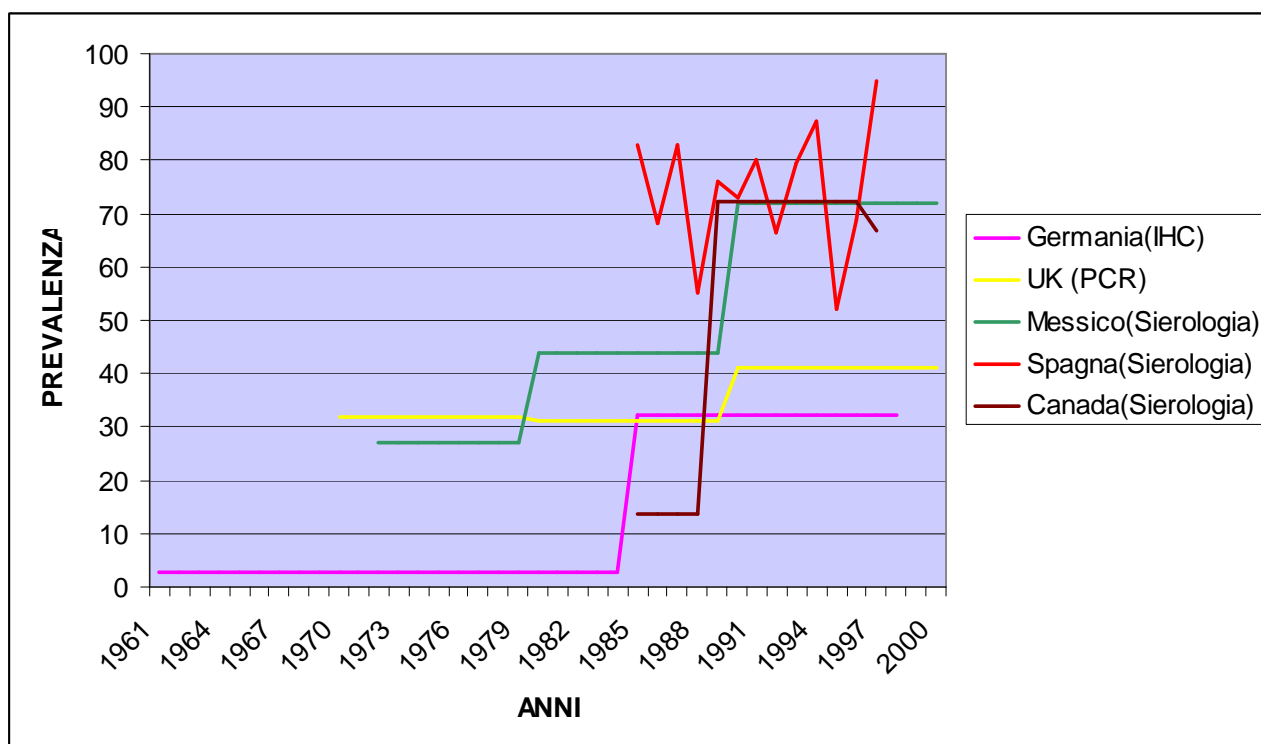


Fig. 5. Modificato da Magar et al., 2000; Rodriguez Arrioja et al., 2003; Grierson et al., 2004; Ramirez Mendoza et al., 2009; Jacobsen et al., 2009.

I dati riguardanti la prevalenza delle diverse sindromi sono estremamente variegati essendo queste condizionate dall'enorme varietà di fattori che possono entrare in gioco condizionandone

lo sviluppo. Dati dell'United State Departement of Agriculture (USDA) propongono una panoramica abbastanza completa sulla presenza di allevamenti con casi di PCVD e della loro evoluzione nel tempo (tab. 8).

**PREVALENZA % DI PCVD PER ANNO, FASE E
DIMENSIONI DI ALLEVAMENTO**

| Anno | Età del Gruppo | Dimensioni Aziendali | | | Complessivo(%) |
|-------------|----------------|----------------------|------------|--------|----------------|
| | | <2000 | 2000-10000 | >10000 | |
| 2000 | Svezzamento | 4,4 | 10,4 | 20,9 | 5,7 |
| | Ingrasso | 2,3 | 8,8 | 12,4 | 3,6 |

| Anno | Età del Gruppo | Dimensioni Aziendali | | | Complessivo(%) |
|-------------|----------------|----------------------|-----------|-------|----------------|
| | | <2000 | 2000-5000 | >5000 | |
| 2006 | Svezzamento | 21,5 | 12,5 | 39,6 | 22,3 |
| | Ingrasso | 25 | 35,5 | 59,9 | 31,1 |

Tab. 8. Tratto da Gillespie et al., 2009

Volendo generalizzare, per quanto concerne le forme cliniche la prevalenza è generalmente bassa, con morbilità fra il 4 e 30% e mortalità del 4-20% (Pogranichniy et al., 2002; Chae et al., 2004; Segalés et al., 2006; Gillespie et al., 2009), con significative variazioni fra i diversi allevamenti (in alcuni impianti è stata descritta una mortalità dell'ordine del 50%). L'Australia rappresenta un'eccezione a questo quadro in quanto non sono mai stati descritti casi di PMWS pur in presenza di circolazione virale (Grau-Roma et al., 2010). Il contesto italiano non è significativamente dissimile da quello sopra descritto. L'infezione da PCV2 è endemica negli allevamenti italiani come evidenziato dagli elevati livelli di sieroprevalenza (sono riportati valori compresi fra il 40 e il 100%) e di positività virologica (valori medi superiori al 40% negli ultimi vent'anni) (Sala et al., 2000; Alborali.,2002; Bresaola et al., 2010) a cui fa riscontro, clinicamente, una prevalenza di PMWS del 5-20%, in calo rispetto al passato (Sarli et al., 2008). È evidente che una tale diffusione virale si fonda su un'altrettanto ampia circolazione di animali a livello globale. I risultati di modelli di diffusione geografica indicano l'esistenza di una rilevante movimentazione di PCV2, con significativi legami fra Nord America, Europa ed Asia e potenzialmente fra Asia e Sud America. L'analisi dei rapporti fra i singoli stati ha permesso di ricostruire analoghi legami sia nel contesto europeo che in quello nord americano. Ciò è rilevante alla luce della corrispondenza fra le vie di diffusione del virus e le principali rotte commerciali di suini vivi. In altre parole gli elevati livelli di movimentazione che sussistono in un mercato

globalizzato, assieme alla presenza di una alta percentuale di animali asintomatici, contribuiscono a creare condizioni ottimali per l'espansione virale (Firth et al., 2009).

3.4. FATTORI DI RISCHIO

Come appena affermato l'infezione da PCV2 presenta una prevalenza elevata cui fa riscontro una morbilità relativamente bassa. Conseguentemente si ritiene che PCV2 sia causa necessaria ma generalmente non sufficiente nella genesi delle PCVD e che si renda quindi necessaria la presenza di altri fattori scatenanti. È tuttavia necessario sottolineare come questi elementi, nonché le eventuali misure di controllo che su questi possono essere impostate, non possono essere considerati unicamente secondo una prospettiva meramente clinica. Essendo stato evidenziato un diverso peso in termini di trasmissione del patogeno fra soggetti infetti e malati il quadro epidemiologico dovrà sempre essere ponderato al fine di una disamina razionale e proficua delle azioni da intraprendere e dei loro benefici.

3.4.1. Variazioni nella virulenza di PCV2

Lo studio filogenetico ha attualmente permesso di classificare la popolazione virale in tre gruppi: PCV2a, PCV2b e PCV2c, quest'ultimo segnalato solo in Danimarca (Grau-Roma et al., 2010). Nel tempo si è tuttavia generata una nomenclatura diversificata e quindi confondente; per chiarezza viene proposto un riassunto della terminologia usata dai diversi autori (tab. 9).

| Segalès et al., (2008) | deBoissezon et al., (2004) | Timmusk et al., (2008) | Carman et al., (2006) | Olvera et al., (2007) | Gomes et al., (2007) | Gagnon et al., (2007) | Grau-Roma et al., (2008) |
|------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|
| PCV2b | I | SG3 | Pattern 321-like | Gruppo 1 | Gruppo A | PCV2b | PCV2 genotipo 1 |
| PCV2a | II | SG1/SG2 | Pattern 422-like | Gruppo 2 | Gruppo B | PCV2a | PCV2 genotipo 2 |

Tab. 9. Nomenclatura dei genogruppi di PCV2 adottata da diversi autori. Grau-Roma et al., 2010

Lo studio della popolazione virale nel tempo ha permesso di evidenziare una globale tendenza allo shifting da PCV2a a PCV2b (Dupont et al., 2008). Sebbene studi iniziali non avessero riscontrato alcuna correlazione fra la sequenza del DNA virale e l'emergenza di PCVD (Olvera et al., 2007) l'opinione a riguardo è radicalmente cambiata nel corso degli ultimi anni a seguito della pubblicazione di recenti lavori. Un crescente numero di articoli ha riportato come lo shift fra le due varianti possa essere correlato alla comparsa di nuovi outbreak o a modificazioni del quadro epidemiologico, sintomatologico ed anatomopatologico. Ad esempio alla fine del 2004 in Canada è stato riscontrato un incremento inaspettato dei casi di PMWS associato ad un aumento della mortalità, della gravità delle lesioni e della quantità di antigene virale presente (Gagnon et al., 2007; Carman et al., 2008) in concomitanza con un netto aumento nella prevalenza di

PCV2b. Analoghe osservazioni sono state riportate in Danimarca (Dupont et al., 2008), Svezia (Timmusk et al., 2008) Svizzera, Usa e Spagna (Cortey et al., 2011). Ciò depone a favore dell'ipotesi che questo shift abbia avuto un ruolo nella comparsa degli outbreak di PMWS in tutto il mondo a partire dai primi anni '90. In aggiunta si ricorda come l'origine di PCV2 venga collocata in un intorno del 1991, ossia in corrispondenza della comparsa dei primi casi clinici (Firth et al., 2009). Tuttavia è importante sottolineare come studi retrospettivi, almeno per quanto concerne il contesto spagnolo e svizzero, hanno evidenziato che PCV2b circolava nel territorio prima (in Spagna già nel 1985) della comparsa delle epidemie di PMWS, sebbene con frequenza significativamente inferiore. Nonostante recenti studi di meta-analisi inerenti infezioni sperimentali rivelino una maggiore facilità nell'indurre PMWS con PCV2b, è necessario ricordare che entrambi i genotipi (2a e 2b) sono in grado di indurre malattia (Cortey et al., 2011). Sulle reali motivazioni sottostanti alla presunta variazione di virulenza non vi sono certezze. Carman et al., (2007) riportano una omologia di sequenza fra i due genotipi per ORF2 e parte di ORF1 pari al 91,6%; analoghi risultati sono stati riportati da Timmusk et al., (2008) sulla base della sequenza di ORF2. In particolare sono stati identificati 52 marker nella sequenza nucleotidica che possono essere sfruttati per discriminazione fra le due varianti. La maggior parte di questi (33) sono collocati nella regione codificante *Cap*. Questo aspetto è di particolare interesse essendo le proteine capsidiche il principale bersaglio della risposta immunitaria e come tali soggette a pressione selettiva. Proprio in quest'ottica è da rilevare come le regioni corrispondenti ai quattro epitopi proposti concentrino la maggior parte delle mutazioni del gene *Cap* e fra queste siano compresi anche quattro marker, determinanti per altre mutazioni non silenti (Olvera et al., 2007). Queste potrebbero determinare un differente potenziale immunogeno, una differente capacità di induzione di anticorpi neutralizzanti o determinare una solo parziale cross-protezione fra i due ceppi che spiegherebbe la maggior sensibilità verso il nuovo genotipo. Tuttavia sebbene l'uso di anticorpi monoclonali abbia evidenziato una certa differenza antigenica, nella pratica clinica l'immunità nei confronti di uno sembra essere protettiva nei confronti dell'altro (Timmusk et al., 2008; Cortey et al., 2011). Un'altra ipotesi più che suggestiva è rappresentata dal fatto che mutazioni nel patrimonio genetico possono indurre alterazioni nella trascrizione, nella traduzione e nella replicazione del genoma nonché interferire a vari livelli con il ciclo virale. Questa teoria è supportata dalla dimostrazione sperimentale che la mutazione di due aminoacidi (110 e 191) modifica la cinetica replicativa in vitro e in vivo (Fenaux et al., 2004). Particolare valore deve essere attribuito a questo evento in considerazione del fatto che l'aminoacido 191 rappresenta uno degli elementi indicativi della distinzione fra PCV2a e b, pur non essendo considerato uno dei marker (Timmusk et al., 2008).

Infine merita attenzione l'osservazione che una classificazione analoga a quella ottenuta a partire dalla sequenza di ORF2 è ottenibile anche sfruttando ORF3 (Timmusk et al., 2008). Al contrario, il gene ORF1 appare altamente conservato fra i diversi isolati, probabilmente perchè sottoposto ad una pressione selettiva negativa di maggior intensità (Olvera et al., 2007). Detta caratteristica si può ripercuotere praticamente nella scelta delle regioni significative da sequenziare ai fini della classificazione e della generazione di alberi filogenetici.

Queste evidenze fanno ritenere che la variabilità genetica si ripercuota in una diversa virulenza, implicata nello sviluppo di PCVD. Tuttavia la questione è tuttora molto dibattuta ed in ogni caso i fattori inerenti al virus sarebbero solo uno dei molti fattori coinvolti nella patogenesi.

3.4.2. Coinfezioni e immunomodulazione

Sebbene PCV2 sia riconosciuto causa necessaria per lo sviluppo di PCVD (Gillespie et al., 2009) e sperimentalmente sia stato possibile riprodurre PMWS in animali convenzionali (ma non gnotobiotici) tramite iniezione di materiali contenente PCV2, è altrettanto evidente che tale condizione sia tipicamente insufficiente a determinare sintomatologia. È stato dimostrato come la coinfezione con diversi altri patogeni, frequentemente riscontrata (tab. 10), determini un aumento dell'incidenza della patologia, della gravità delle lesioni e della sintomatologia. Sebbene il quadro possa cambiare in virtù del contesto epidemiologico, uno studio americano su suini affetti da PCVD ha evidenziato la coinfezione con PRRSV nel 54% dei casi, con *M.hyo pneumoniae* nel 36%, con polmoniti e/o setticemie batteriche nel 22% e con l'influenza suina nel 5,4%. L'infezione con solo PCV2 è stata dimostrata solo nel 2% dei casi (Opriessnig et al., 2007b). Le cause primarie alla base di questa evidenza non sono ancora del tutto comprese. Sono state tuttavia avanzate più ipotesi che da sole o in compartecipazione possono fornire alcune indicazioni. L'attivazione del sistema immunitario è riconosciuta come un evento cardine nella patogenesi. Non si deve infatti dimenticare come questo virus dipenda interamente dalle DNA polimerasi cellulari per la replicazione e come tale necessiti di cellule mitoticamente attive. L'immunostimolazione, indotta potenzialmente da molteplici patogeni, condiziona la proliferazione delle cellule target e conseguentemente la replicazione virale (Krakowka et al., 2001; Ellis et al., 2004). È stato riscontrato come anche l'immunostimolazione indotta da vaccini contro *M.hyo pneumoniae*, *A.pler pneumoniae*, PRRSV e peste suina classica possono indurre analoghi effetti. Tuttora dibattuto è l'effetto degli adiuvanti a veicolo oleoso (Opriessnig et al., 2003; Grau-Roma et al., 2010). L'alterazione della produzione citochinica da parte di un agente rappresenta un altro elemento di cui PCV2 potrebbe beneficiare. Questa ipotesi, già proposta da Ellis et al., (2004) è stata poi confermata, almeno per quanto concerne PRRS, da Shi et al., (2010) i quali hanno evidenziato il reciproco vantaggio conseguente all'alterazione

dell'espressione dei diversi mediatori indotta dai singoli virus. Paradossalmente anche l'immunosoppressione sembra essere positivamente correlata allo sviluppo di PCVD. La somministrazione di Ciclosporina e Desametazone si è rivelata in grado, rispettivamente, di prolungare la viremia e determinare una maggiore gravità delle lesioni rispetto ai controlli (Gillespie et al., 2009). Analogamente agenti patogeni o condizioni manageriali/ambientali determinanti una calo della risposta immunitaria potrebbero esitare in analoghe conseguenze.

| | Agente | Report | Stato |
|------------------------------|---|---|---|
| Virus | PRRS | Gagnon et al., (2007) Larochelle et al., (2003) Dewey et al., (2006) Pallares et al., (2002) Pogranichniy et al., (2002) Dorr et al., (2007) Calsamiglia et al., (2007) Fraile et al., (2009) Segale set al., (2002) Quintana et al., (2001) Rose et al., (2003) Welleberg et al., (2004) Kim et al., (2002) Kawashima et al., (2007) Muratami et al., (2006) | Canada Canada Canada U.S.A. U.S.A. U.S.A. Spagna Spagna Spagna Spagna Francia Paesi Bassi Corea Giappone Giappone |
| | <i>Porcine parvovirus</i> | Ellis et al., (2000) Rose et al., (2003) Cao et al., (2005) Kim and Chae, (2002) | Canada Francia Cina Corea |
| | <i>Porcine epidemic diarrhoea virus</i> | Hirai et al., (2001) | Giappone |
| | <i>Aujeszky's disease virus</i> | Rodriguez-Arrijoja et al., (1999) Quintana et al., (2001) Cao et al., (2005) | Spagna Spagna Cina |
| | <i>Hepatitis E virus</i> | Martin et al., (2007) | Spagna |
| | <i>Torque teno virus</i> | Gagnon et al., (2007) Horlen et al., (2008) Kekarainen et al., (2006) | Canada U.S.A. Spagna |
| | <i>Porcine Teschovirus</i> | Takahashi et al., (2008) | Giappone |
| | <i>Swine influenza virus</i> | Dorr et al., (2007) Pallares et al., (2002) | U.S.A. U.S.A. |
| Batteri | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> | Dewey et al., (2006) Dorr et al., (2007) Pallares et al., (2002) | Canada U.S.A. U.S.A. |
| | <i>Mycoplasma hyorhinitis</i> | Gagnon et al., (2007) Kawashima et al., (2007) | Canada Giappone |
| | <i>Mycoplasma suis</i> | Pereyra et al., (2006) | Argentina |
| | <i>Salmonella colera suis</i> | Murakami et al., (2006) | Giappone |
| | <i>Escherichia coli</i> | Dewey et al., (2006) | Canada |
| | <i>Haemophilus parasuis</i> | Kim et al., (2002) | Corea |
| Patogeni opportunisti | <i>Pneumocystis carinii</i> | Clark (1997) | Canada |
| | <i>Candida albicans</i> | Zlotowski et al., (2006) | Brasile |
| | <i>Aspergillus spp</i> | Segalés et al., (2003) | Spagna |
| | <i>Cryptosporidium parvum</i> | Nunez et al., (2003) | Spagna |
| | <i>Chlamydia spp.</i> | Carrasco et al., (2000) | Spagna |
| | <i>Zygomycetes spp</i> | Szeredi and Szentirmai (2008) | Ungheria |

Tab. 10. Coinfezioni riscontrate in casi di PMWS in condizioni di campo. Tratto da Grau-Roma et al., 2010

3.4.3. Fattori legati all'ospite

Si è precedentemente accennato al possibile ruolo della componente genetica dell'animale nella patogenesi delle PCVD. Sebbene tutte le razze siano soggette all'infezione e allo sviluppo di malattia diversi studi hanno posto in evidenza come per alcune di esse la suscettibilità sia maggiore. La razza Landrace si è dimostrata più suscettibile rispetto a Pietrain, Duroc e Large White (Opriessnig et al., 2006a; Opriessnig et al., 2009b). McIntosh et al., (2006) hanno evidenziato l'escrezione virale nel seme di verri Landrace e Duroc, ma non in Large White e Meishan. L'importanza delle linee genetiche è stato riportato da Lopez-Soria et al., (2004), evidenziando una maggiore viremia nella progenie avente linea paterna costituita da 25% Large White- 75% Duroc (Opriessing et al., 2009b). Tuttavia si ritiene che il ruolo predisponente della componente genetica non sia né pertinenza di singoli loci genici né limitata a singole razze. Conseguentemente non tutte le linee e gli individui appartenenti ad una razza sarebbero latori di un corredo sfavorevole. Differenze quali-quantitative in particolare nella risposta adattativa all'infezione, condizionata dalla componente genica, sono state addotte come concause del differente esito dell'infezione (Opriessnig et al., 2007b; Gillespie et al., 2009). Recentemente Karlskov-Mortensen et al. (2008) hanno riportato che il cromosoma suino 13 potrebbe contenere geni conferenti suscettibilità a PMWS. Uno dei candidati sarebbe il gene codificante MyRIP, una proteina implicata nel trafficking cellulare e nell'esocitosi. È stato quindi speculato che la persistenza di PCV2 nelle vescicole cellulari sia riferibile all'alterazione del trasporto citosolico mediato da MyRIP. Tuttavia la piena conoscenza dei vari determinanti genici è ben lungi dall'essere raggiunta.

3.4.4. Fattori manageriali e ambientali

L'aspetto gestionale svolge senza ombra di dubbio un ruolo fondamentale nel controllo dell'infezione da PCV2 essendo in molti casi possibile ridurre fino ad annullare l'impatto economico di questo patogeno tramite un valido management e l'adozione di adeguate pratiche di igiene (Madec et al., 2008) (tab. 11). Le modalità con cui questa componente può contribuire nella patogenesi sono molteplici e comprendono l'interazione sia con il patogeno che con l'individuo ospite. Procedendo per punti, è evidente che le caratteristiche strutturali, funzionali e gestionali di un allevamento condizionano la circolazione virale, la probabilità e le vie di trasmissione, la pressione infettante e il timing dell'infezione. In secondo luogo può essere condizionata, più o meno direttamente, l'attività del sistema immunitario ed in generale lo stato di salute dell'animale: immunità materna, immunostimolazione ed immunosoppressione sono

aspetti che vengono condizionati dalle pratiche di allevamento ed entrano in gioco in modo significativo nel determinare l'esito dell'infezione (Madec et al., 2000).

| Settore | Fattore considerato | Effetto sul rischio di PCVD |
|---|---|-----------------------------|
| Strutture | Elevato numero di scrofe | > |
| | Gruppi numerosi nel settore svezzamento e ingrasso | > |
| | Vicinanza ad altri allevamenti suini | > |
| | Mangiatoie separate fra le diverse unità di ingrasso | < |
| | Presenza di docce | < |
| Management | Alte percentuali di pareggiamenti | > |
| | Grande variabilità di età e peso allo svezzamento | > |
| | Flusso continuo di suini nel reparto svezzamento | > |
| | Acquisto di scrofette per rimonta esterne | > |
| | Svezzamento precoce (<21gg) | > |
| | Divisione dei suini per sesso allo svezzamento | < |
| | Maggiore peso allo svezzamento | < |
| | Allevamento delle scrofe i gruppo durante la gravidanza | < |
| | Uso di seme da centri esterni | < |
| | Produzione interna di seme | > |
| | Valide misure di biosicurezza aziendali | < |
| | Livelli di igiene (all-in/all-out) e disinfezioni settore parto e svezzamento | < |
| | Vuoto sanitario < 5 gg | > |
| | Titoli elevati di sieropositività materna per PCV2 al parto | < |
| | Infezione precoce dei suinetti | > |
| Svezzamento precoce dei suinetti più pesanti e uso di pre nursery | < | |
| Controllo "pests" | <? | |
| Migliore ventilazione | <? | |
| Vaccinazioni | Vaccinazione delle scrofe contro PRRS | > |
| | Vaccinazione delle scrofe contro E.coli | >< |
| Trattamenti | Uso di vaccini separati contro Erysipelas e Parvovirus | > |
| | Scarsa tecnica di iniezione (esita in ascessi e altre lesioni) | > |
| Nutrizione | Vaccinazione delle scrofe contro la rinite atrofica | < |
| | Trattamenti regolari contro gli ectoparassiti | < |
| Coinfezioni | Uso di ossitocina durante il parto | < |
| | Aumento colesterolo e antiossidanti nell alimento | <? |
| | Somministrazione di fitosteroli immunomodulatori | < |
| | Uso di spray dried plasma | < |
| | Sieronegatività PRRS e PPV | < |
| | Sieroconversione per PPV durante la gravidanza | > |

Tab 11 ? = Conclusioni ritenute probabili ma che richiederebbero ulteriori approfondimenti. Tratto e modificato da Madec et al., 2000; Rose et al., 2003; Madec et al., 2008; Misinzo et al., 2009; Verreault et al., 2010; Blunt et al., 2010; Grau-roma et al., 2010.

4. DIAGNOSI

La diagnosi di PCVD presenta non poche difficoltà. In primo luogo è necessario ricordare come sebbene PCV2 sia sostanzialmente ubiquitario ed in taluni casi coinvolgente la totalità della popolazione animale, l'insorgenza di malattia è nettamente meno frequente. L'impossibilità di associare con costanza la presenza dell'agente eziologico alla PCVD rappresenta uno dei principali limiti delle metodiche di diagnostica di laboratorio, rendendo potenzialmente non significativi i risultati ai fini della pratica clinica. Parallelamente anche il quadro sintomatologico sovente non si presenta nella sua completezza, venendo spesso alterato nei suoi elementi caratteristici dall'azione di altri patogeni, siano essi implicati nella patogenesi o semplici agenti di irruzione secondaria (Chae et al., 2004). È stato infatti evidenziato come solamente nel 50% circa dei casi riferiti da veterinari, definiti come "esperti", la diagnosi di PCVD sia stata confermata all'istologia (Opriessnig et al., 2007b). Conseguentemente per la diagnosi di PMWS (Chae et al., 2004) ed in generale PCVD (Gillespie et al., 2009) nel singolo individuo si rendono necessarie: (I) la presenza di segni clinici compatibili, (II) la presenza di caratteristiche lesioni microscopiche, (III) la dimostrazione di PCV2 nella lesione (attualmente le tecniche maggiormente usate in tal senso sono l'ISH e IHC). Le forme sistemiche sono caratterizzate dal riscontro del patogeno a livello di più di un tessuto linfoide o un tessuto linfoide e almeno un organo o di due o più organi. Vice versa se un'elevata presenza di antigene virale è associato solo ad un particolare organo o sistema allora si ricade nell'ambito delle forme localizzate (Opriessnig et al., 2007b). Nella pratica di allevamento il problema clinico riscontrato nel singolo individuo risulta secondario se comparato al contesto generale del gruppo. È nuovamente necessario ricordare come diagnosi di PCVD in singoli animali possa essere fatta in aziende con ottime performances produttive. La distinzione fra la presenza di casi sporadici di PCVD e condizioni che rappresentino un problema a livello di allevamento è quindi necessaria. Nell'ambito del "The Control of Porcine Circovirus Diseases (PCVDs): Towards Improved Food Quality and Safety (Sixth framework programme)" sono stati proposti alcuni criteri per la diagnosi di PMWS a livello di allevamento. In primo luogo deve essere riscontrato un incremento della mortalità, definito come: (I) la presenza di mortalità maggiore uguale ai livelli storici più 1,66 SD, (II) mortalità significativamente maggiore riscontrata tramite Test del chi-quadrato, (III) in assenza di dati storici si può considerare indicativo di PMWS una mortalità superiore del 50% rispetto ai livelli regionali o nazionali. In seguito all'esame anatomico-istopatologico, eseguito su almeno cinque soggetti, l'allevamento è considerato positivo quando sintomi, lesioni macroscopiche e istopatologiche indicative, sono tutte riscontrate in almeno uno

dei soggetti. In altre parole quando la diagnosi di PMWS conseguita usando i criteri individuali è ottenuta in almeno 1/5 dei soggetti. Considerazioni estremamente simili sono state tratte in generale considerando le PCVD nel loro complesso. Fatti salvi i criteri inerenti la mortalità, l'unico elemento di divergenza è rappresentato dalla proporzione di singoli soggetti affetti necessaria a considerare PCVD un problema a livello di allevamento. Sussiste infatti una discrepanza che appare tuttavia logica essendo la PMWS un sottoinsieme delle PCVD. Nello specifico PCVD viene diagnosticato a livello di allevamento qualora risultino positivi il 50% dei soggetti facenti parte di un campione significativo dell'allevamento. Conseguentemente se PCVD vengono diagnosticate in meno del 50% dei soggetti o se non si assiste a significative variazioni nella mortalità aziendale si devono considerare sporadici i casi rilevati (Opriessnig et al., 2007b; Gillespie et al., 2009).

Di seguito viene proposta una breve disamina delle modalità diagnostiche utilizzate.

4.1.1. Diagnosi clinica e anatomoistopatologica

Vengono qui descritti solamente alcuni elementi significativi; per una descrizione più approfondita della sintomatologia e delle lesioni nelle singole sindromi si rimanda ai capitoli specificatamente dedicati. In sintesi i segni clinici riscontrati con maggiore frequenza risultano essere dimagrimento (98,1%), inappetenza (90,4%), diarrea (77,2%), dispnea (75,1%), linfadenopatia (44,8%), ittero (37,1) e morte (96,8%) (Gillespie et al., 2009). Macroscopicamente è possibile evidenziare diverse tipologie di lesioni come riportato nella tab. 6. Per quanto concerne l'istologia si ricorda in particolare il caratteristico quadro di deplezione linfocitaria associato ad infiammazione granulomatosa nei tessuti linfoidi. Risulta inoltre indicativo il riscontro di cellule sinciziali e la presenza di corpi inclusi. Diversi autori hanno proposto degli "scoring system" implicanti l'assegnazione di un punteggio proporzionale alla gravità delle lesioni macroscopiche e microscopiche. Questi, sommati allo score inerente l'IHC, consentirebbe la classificazione della gravità dei casi di PCVD (tab. 12).

| | 0 | 1 | 2 | 3 |
|--|---------|--|----------------|---|
| Deplezione linfocitaria | Assente | Lieve con perdita globale di cellularità | moderata | Grave con perdita della struttura follicolare |
| Infiammazione istiocitara-granulomatosa | Assente | Lieve | Moderata | Grave, sostituisce la struttura dei follicoli |
| Antigene PCV2 (percentuale dei follicoli linfoidi che presentano cellule positive all'IHC) | Assente | Meno del 10% | Fra il 10%-50% | Più del 50% |

Tab. 12. Scoring system inerente la gravità delle lesioni nel sistema linfoide e il quantitativo di antigene presente (Opriessnig et al., 2007b).

Tuttavia questi risultano utili principalmente ai fini sperimentali e difficilmente realizzabili nella pratica clinica (Opriessnig et al., 2007b; Krakowka et al., 2007). La mancanza di standardizzazione dei protocolli e dei punteggi assegnati rende estremamente complessa la comparazione fra i diversi casi.

4.1.2. Sierologia

I livelli estremamente alti di prevalenza dell'infezione e l'evidenza che soggetti infettatisi, e quindi sieropositivi, possono non presentare sintomatologia rappresenta un forte limite di queste tecniche. La sierologia risulta utile se utilizzata al livello di allevamento per determinare il timing dell'infezione tramite studi longitudinali o trasversali sulla popolazione. Risulta inoltre utile al fine di definire gli allevamenti PCV2 free e monitorarne lo stato.

Indirect immunofluorescent antibody assay (IFA). È un test rapido ed economico che si basa sul riconoscimento di PCV2 in coltura da parte del siero in esame i cui anticorpi vengono poi evidenziati da anti-gammaglobuline marcate con sonde fluorescenti. La necessità di coltivare cellule infettate con PCV2, procedura relativamente problematica in virtù del ciclo replicativo lento e della necessità di indurre la mitosi nelle cellule in coltura, è stata superata dall'utilizzo di singole proteine virali (ORF2) espresse in vettori eucarioti. In aggiunta si è ottenuta una specificità del 100% e una sensibilità quasi doppia rispetto alla precedente metodologia (Racine et al., 2004). Tuttavia, trattandosi di una metodica non automatizzata e operatore dipendente, richiede la presenza di personale esperto e debitamente formato e risulta quindi di difficile gestione per diversi laboratori. Inoltre viene considerata eccessivamente lenta qualora si renda necessario lo screening di un numero elevato di campioni (Walker et al., 2000).

Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA). Concettualmente simile all'IFA con la differenza che l'anticorpo secondario è marcato con una perossidasi. Anche per quanto concerne vantaggi e svantaggi tende a rispecchiare il quadro delineato per l'IFA sebbene generalmente permetta di ottenere titoli anticorpali più elevati. La comparazione fra i risultati ottenuti da laboratori europei e canadesi su 20 sieri ha evidenziato un'elevata variabilità inter-laboratorio sia per IFA che per IPMA (Opriessnig et al., 2007b).

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). L'uso di tecniche ELISA indiretta permette di ovviare a molti dei problemi sopra citati e garantisce un'elevata sensibilità. La possibilità di automatizzazione risulta vantaggiosa sia in termini di tempo che di oggettività del risultato, limitando i "bias" connotati all'interpretazione dell'IFA e dell'IPMA. Recentemente è stata descritta (Yin et al., 2010) una ELISA basata su una proteina ricombinate solubile costituita da ORF2 fusa a GST espressa da *E.coli*. I vantaggi di questa metodica sono molteplici. In primo luogo un aumento della specificità conseguenza del fatto che è stata riscontrata una certa cross-

reattività delle proteine *Rep* di PCV1 e 2 e quindi del virus in toto. Al contrario la proteina *Cap*, oltre a rappresentare il maggior determinante antigenico, si è dimostrata un antigene tipo specifico. In secondo luogo è possibile produrre l'antigene facilmente, in breve tempo ed a costi ridotti. Negli ultimi anni sono stati messi in commercio kit ELISA IgM o IgG specifici. Ciò risulta utile al fine di determinare il timing dell'infezione. Sebbene con una certa approssimazione, è stato possibile individuare delle categorie di infezione: IgM>IgG fasi precoci dell'infezione (all'incirca entro 20gg), IgM<IgG infezione attiva (fra 20 e 50 giorni circa), IgM negativo e titoli elevati di IgG infezione nelle fasi tardive o in risoluzione.

Siero neutralizzazione. Si è precedentemente discusso sul fondamentale ruolo svolto dagli anticorpi neutralizzanti nell'ambito della clearance virale e della protezione offerta nei confronti dello sviluppo della malattia. Il test si basa fundamentalmente sulla capacità del siero, a diverse diluizioni, mescolato con titoli virali noti, di inibire l'infezione di colture cellulari incubate con detta miscela. Poiché PCV2 non induce alcun effetto citopatico l'avvenuta infezione deve essere dimostrata con FA o con l'immunoperossidasi. Oltre ai limiti di queste tecniche è necessario aggiungere i problemi correlati alla disponibilità delle colture cellulari e alla necessità di pre-trattarle al fine di sincronizzarne i cicli cellulari. In aggiunta è stato dimostrato come gli anticorpi neutralizzanti siano indotti lentamente e risultino evidenziabili con le metodiche classiche solo tardivamente. È stata quindi proposto un test dotato di maggiore sensibilità che può supplire le mancanze della metodica classica nelle prime fasi dell'infezione, dimostrando lo sviluppo della risposta già 10 DPI (Meerts et al., 2006). L'insieme di questi elementi rende la sieroneutralizzazione difficile e poco pratica da eseguire.

4.1.3. Identificazione virale e degli antigeni

Immunoistochimica (IHC). L'IHC utilizza anticorpi monoclonali o policlonali per rilevare gli antigeni di PCV2 su sezioni di tessuto fissate in formalina. Tipicamente vengono combinate anticorpi primari PCV2 specifici e anticorpi anti-anticorpi primari marcati. Assieme all'ISH rappresenta il gold standard per la diagnosi di PCVD in quanto permette di dimostrare la presenza di PCV2 associato alla lesione. In aggiunta diversi studi hanno evidenziato una correlazione positiva fra la quantità di antigene presente e la gravità delle lesioni e della sintomatologia clinica (Karkowka et al., 2005). Significativa è altresì la possibilità, combinando i risultati dell'istologia a quelli dell'IHC, di ottenere delle informazioni sullo stadio dell'infezione (tab. 13).

| | Acuta (7-14DPI) | Sub-acuta (10-21DPI) | Cronica (21-28DPI) | In risoluzione (28-49DPI) |
|---------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Deplezione | 0-1 | 2-3 | 3 | 2-3 |
| Infiammazione | 0-1 | 1 | 2-3 | 2-3 |
| AntigenePCV2 | 3 | 3 | 2-3 | 0-1 |

Tab. 13. Tratta da Opriessnig et al., 2007b. Stima del timing dell'infezione sulla base di deplezione linfocitaria, infiammazione granulomatosa e presenza di antigenene virale nell'ambito del tessuto linfoide.

L'antigene (e il DNA) è frequentemente identificabile nel citoplasma di istiociti, cellule giganti multinucleate ed in generale in cellule della linea monocito/macrofagica e dendritica. Più raramente si riscontrano, anche nel nucleo, nell'epitelio respiratorio, renale, enterico e pancreatico, nell'endotelio vasale, nei linfociti, nel fegato e nella muscolatura liscia (Segalés et al., 2004b). Per quanto concerne i feti il tessuto d'elezione è rappresentato dal miocardio, sebbene, con il progredire della gestazione fino alla nascita, sviluppino progressivamente quadri più simili a quelli appena descritti (Sanchez et al., 2003; Madson et al., 2009b). L'IHC fornisce una colorazione più intensa ed è considerata più sensibile ma meno specifica dell'ISH (Gillespie et al., 2009). È tuttavia necessario sottolineare come nello studio di riferimento (McNeilly et al., 1999) sia stata sfruttata una sonda per PCV1. Un più recente lavoro ha difatti evidenziato un'opposta tendenza per quanto concerne la sensibilità delle metodiche (Kim et al., 2004a). Attualmente sia l'ISH che l'IHC risultano in grado, in particolare quando rivolte verso ORF2 o la corrispondente proteina, di discriminare fra PCV1 e 2 (Chae et al., 2004; Ha et al., 2005).

Senza entrare nel dettaglio, l'IHC risulta molto sensibile nella diagnosi di PCVD mentre questo parametro risulta minore per l'evidenziazione di bassi titoli di PCV2. È stato infatti determinato che sono necessari circa 10^8 PCV2 ogni 500ng di DNA per ottenere una colorazione visibile in IHC (Brunborg et al., 2004).

Isolamento virale. Sebbene diverse colture cellulari possono sostenere la replicazione di PCV2 le più frequentemente usate risultano le cellule PK-15. Queste possono essere inoculate con successo con fluidi corporei o con omogenati di tessuto. Il trattamento con glucosammina si è rivelato efficace nell'incrementare la replicazione virale. L'assenza di un effetto citopatico rende impossibile determinare direttamente l'esito del test ed è quindi necessario ricorrere all'IFA/FA o all'IPMA. Questa metodica non viene eseguita routinariamente essendo dispendiosa in termini di tempo e non sempre efficiente poiché per la sua realizzazione è necessario disporre di virioni vitali. Condizioni e tempi di trasporto non adeguati e fenomeni di autolisi nei campioni possono diminuire le probabilità di successo. Potenzialmente questa tecnica può essere sfruttata anche ai fini della quantificazione del titolo virale inoculando PK-15 con diluizioni seriali del campione considerato (Krakowka et al., 2005).

IFA/FA su sezioni di tessuto. Questa tecnica sfrutta anticorpi monoclonali o antisieri per rilevare antigeni virali su sezioni di tessuto congelato. Questi possono essere direttamente marcati (FA) o venir rilevati da immunoglobuline marcate rivolte contro gli anticorpi primari (IFA). Pur essendo rapido non viene molto usato in quanto non permette di associare con adeguata sicurezza l'antigene alla lesione e l'interpretazione risulta relativamente soggettiva.

Antigen-capture ELISA. Sono state descritte tecniche di antigen-capture ELISA eseguite su omogenato di tessuto ed i risultati si sono rivelati comparabili all'isolamento virale quantitativo e all'IHC. Tuttavia è evidente come questa metodologia non permetta un'associazione diretta fra il riscontro dell'antigene e la lesione.

Microscopia elettronica (ME). La ME è una tecnica molto dispendiosa in termini di tempo e denaro, richiede personale specializzato e presenta una bassa sensibilità. In aggiunta non permette una precisa identificazione di specie ma solamente l'osservazione di particelle Circovirus-like. Da tutto ciò si può intuire come sostanzialmente non si faccia uso di questa metodica se non in un numero limitato di studi sperimentali.

4.1.4. Rilevamento degli acidi nucleici

In situ hybridization (ISH). L'ISH utilizza delle sonde a DNA marcate, tipicamente con digoxigenin-dUTP (Kim et al., 2003a), corrispondenti a specifiche porzioni del genoma virale. Queste sono in genere rappresentate da tratti di ORF2 in considerazione del fatto che l'omologia di sequenza rispetto a PCV1 è minore. L'interazione viene poi palesata sfruttando la reazione di anticorpi primari e successivamente secondari marcati. Come l'IHC permette di visualizzare PCV2 contestualmente alla lesione. È tuttavia possibile riscontrare una serie di problematiche che possono interferire con la sensibilità diagnostica. La prolungata fissazione in formalina dei tessuti può determinare un'estesa rete di cross-legami proteici che potrebbe ostacolare l'accesso della sonda al DNA. Per ovviare a ciò è stato ottimizzato un pre-trattamento basato sulla digestione del tessuto con proteinasi K e successiva esposizione a variazioni termiche mediante l'uso di un termociclatore. Un ulteriore limite è rappresentato dalla possibilità che il genoma virale si degradi nel tempo, esitando in una minore affinità di legame (McNeilly et al., 1999). Tuttavia l'ISH è stata utilizzata con successo in studi retrospettivi effettuati su campioni risalenti sino al 1962 (Jacobsen et al., 2009), sminuendo quindi l'importanza di questo fattore. In definitiva i principali punti a sfavore rispetto all'IHC sono rappresentati dai maggiori costi e dalla maggiore complessità tecnica della sua esecuzione (Ha et al., 2005).

Polymerase chain reaction (PCR). Sono stati descritti diversi protocolli diagnostici basati sull'uso della PCR. Per brevità ci limiteremo qui a brevi considerazioni, rimandando per un maggior approfondimento sulla metodica al capitolo dedicato. Oltre alla PCR classica sono state

proposte diverse varianti: I) multiplex PCR, rivolte sia verso altri patogeni che verso controlli interni; II) nested PCR, finalizzate a rilevare anche quantità estremamente basse di DNA, incrementando la sensibilità della metodica; III) multiplex-nested PCR; IV) real-time PCR, in grado di quantificare il numero di copie di genoma virale presente nel tessuto. Ulteriori metodiche sono rappresentate dalla RT-PCR e dalla real time RT-PCR, finalizzate a evidenziare i trascritti PCV2 specifici riscontrabili nelle cellule e nei tessuti solamente in presenza di un'attiva replicazione virale (Yu et al., 2005; Yu et al., 2007b). Molte delle considerazioni fatte per la sierologia sono riproponibili anche per la PCR. La maggior parte degli animali vengono a contatto con PCV2 nel corso della loro vita subendo un'infezione, spesso di lunga durata, del tutto asintomatica. Ne consegue che sotto questo punto di vista la PCR possa essere considerata addirittura troppo sensibile (Opriessnig et al., 2007b) e quindi dotata di scarso significato se non consapevolmente interpretata. Le comuni metodiche di PCR non possono quindi rimpiazzare da sole la diagnostica clinica e microscopica, pur potendo supportarle evidenziando la presenza di PCV2 nel tessuto presentante lesioni compatibili alla PCVD (Chae et al., 2004). Le metodiche quantitative rappresentano una significativa eccezione essendo stato individuato un valore predittivo dei titoli virali riscontrati nei tessuti e nel siero sull'esito clinico dell'infezione (Olvera et al., 2004; Brunborg et al., 2004; Krakowka et al., 2005; Segalés et al., 2005b; McIntosh et al., 2009). L'uso di real-time PCR permette di differenziare quindi le infezioni da PCV2 rispetto alle PCVD sulla base della quantità di PCV2 presente.

4.1.5. Caratterizzazione di PCV2

Restriction fragment length polymorphism (RFLP). L'uso di diversi enzimi di restrizione riconoscenti diverse sequenze nucleotidiche permette di rilevare la presenza di polimorfismi genetici. Un diverso genoma determina una differente possibilità di azione di questi enzimi e conseguentemente la formazione di segmenti di DNA di diversa lunghezza che, come tali, risultano facilmente differenziabili mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio. Questa metodica, sebbene talvolta utilizzata con profitto (come da Carman et al., 2008) appare limitata in considerazione del fatto che differenze nella sequenza nucleotidica possono interessare anche regioni diverse dai siti di restrizione, permettendo quindi solo una grossolana categorizzazione degli isolati. Particolare attenzione deve quindi essere posta nell'interpretazione dei risultati.

Sequenziamento. L'analisi della sequenza nucleotidica permette una più raffinata classificazione dei diversi isolati nonché la ricostruzione di alberi filogenetici (Olvera et al., 2007; Dupont et al., 2008; Timmusk et al., 2008; Firth et al., 2009). Date le conoscenze attuali ciò risulta particolarmente utile ai fini epidemiologici, per monitorare l'evoluzione e le dinamiche della diffusione virale. Come precedentemente riportato alcune informazioni iniziano

ad emergere in merito alla relazione fra genoma virale e virulenza. Sebbene allo stato attuale le informazioni a nostra disposizione siano ancora manchevoli, il progredire della conoscenza potrebbe incrementare le potenzialità di questa tecnica. (Opriessnig et al., 2007b; Grau-Roma et al., 2010).

5. PREVENZIONE E CONTROLLO

Fin dalla loro comparsa le PCVD hanno determinato significative perdite economiche. Stime inerenti alle sole PMWS e PNDS hanno evidenziato come un incremento protratto delle mortalità post-svezzamento al 20% si traduca in un aumento dei costi fino a 12,6 € per suino venduto (al peso di 95 Kg). Il che corrisponde a circa 27500 € annui ogni 100 scrofe, stimando 22 suinetti venduti per scrofa all'anno. L'incremento dei costi si compone essenzialmente dei costi diretti legati alla mortalità, dei costi di produzione precedenti alla morte, dei costi di trattamento e degli effetti sulla produzione (viene stimato un peggioramento degli indici di conversione alimentare di 0,2 punti ed un incremento dei giorni di allevamento necessari prima della macellazione fino a 21 gg) (MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION-April 2002). Queste stime non tengono tuttavia conto delle altre sindromi PCV2 indotte, in particolare dei disordini riproduttivi, nonché dei costi aggiuntivi e delle complicazioni gestionali necessarie a limitarne l'impatto tramite mezzi di profilassi diretta ed indiretta. Infine non viene considerato il ruolo dei soggetti asintomatici. Sebbene alcuni studi (Allan et al., 2007) non abbiano evidenziato alcuna variazione nelle performances indotta da PCV2 altri (Opriessnig et al., 2007a) sembrano supportare una significativa importanza economica delle infezioni subcliniche. In aggiunta ai possibili effetti diretti è stato dimostrato il ruolo di questo patogeno nel diminuire l'efficacia di altri vaccini (Opriessnig et al., 2006c), fungendo quindi da fattore interferente con il controllo del PRDC e di altre patologie. Da ciò si deduce l'importanza della lotta alle PCVD e, per quanto possibile, a PCV2. La mancanza di disponibilità di vaccini fino al 2004 ha incoraggiato un ampio, sebbene non sempre proficuo, studio delle misure finalizzate a ostacolare la diffusione del agente eziologico e contrastarne le manifestazioni. La comparsa delle PCVD deve quindi rappresentare un ulteriore stimolo per considerare le modalità di rapportarsi a queste patologie a carattere multifattoriale. Lo studio e l'azione non possono e non devono limitarsi al patogeno ma mirare ad un approccio multidisciplinare che consideri la salute animale nel suo complesso.

5.1. PREVENZIONE

Come più volte evidenziato PCV2 ha circolato per anni a livello mondiale prima che se ne sospettasse l'esistenza. Conseguentemente in una percentuale variabile, ma pur sempre rilevante, di allevamenti l'infezione si era ormai radicata prima ancora che si potessero solo ipotizzare misure di biosicurezza mirate a evitarne l'ingresso in azienda. In aggiunta l'elevata prevalenza, la resistenza virale, il carattere tipicamente asintomatico dell'infezione e la lunga durata dell'escrezione virale rendono assai arduo il mantenimento dell'indennità o quantomeno il

contrastare l'ingresso di nuovi ceppi. I principi generali non sono sostanzialmente dissimili da quelli che devono essere rispettati nei confronti di altri patogeni. Già in fase di progettazione dovrebbero essere previsti una serie di requisiti strutturali finalizzati sia ad ostacolare direttamente la penetrazione dei patogeni in allevamento sia a rendere più agevoli le diverse procedure che il perseguimento di questo fine impone. Dovrebbe essere scelta un'area a scarsa densità di allevamento suino (è stato evidenziato che un'azienda ha nove volte più probabilità di essere interessata da PCVD in presenza di un'altra azienda infetta nel raggio di 3 Km), l'azienda dovrebbe essere separata dall'esterno a mezzo di recinzioni e cancelli, dovrebbero essere previste apposite aree di carico e scarico per animali, alimenti e altri prodotti, preferenzialmente esterne all'allevamento, facilmente pulibili e disinfettabili. Sempre esterne all'allevamento dovrebbero essere previste delle strutture per le misure quarantenarie. Di ancora maggior rilievo risultano gli aspetti gestionali. Questi si concretizzano sostanzialmente nell'agire nei confronti di tutti i potenziali veicoli di trasmissione diretta ed indiretta, minimizzando i rischi inevitabilmente associati alle movimentazioni verso l'interno e l'esterno dell'azienda. È ovviamente necessario garantirsi importazioni (animali da ingrasso, scrofette, seme ecc.) solamente da allevamenti di cui si conosca e verifichi, anche tramite esami a campione, lo stato sanitario. Per quanto concerne i possibili vettori di trasmissione indiretta è necessario agire sulla pulizia e disinfezione dei locali, sull'igiene e abbigliamento del personale (pulizia/cambio di stivali e vestiario, presenza di docce, divieto di frequentare altri allevamenti suini e di portare alimenti di origine suina in azienda ecc). Analoghe misure di biosicurezza andrebbero attuate per tutti i visitatori dell'allevamento. Devono essere stabiliti appositi itinerari e protocolli per limitare il rischio di introduzione del patogeno tramite i mezzi di trasporto. Devono inoltre essere previsti efficaci sistemi di lotta a vettori animali quali insetti, ratti, uccelli e animali selvatici, con particolare riferimento al cinghiale nelle aree ove questa popolazione è presente (MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION-April 2002).

5.2. CONTROLLO

La necessità di convivere con l'infezione limitandone i danni rappresenta indubbiamente il quadro più comune con cui allevatori e veterinari devono confrontarsi. L'introduzione di vaccini efficaci ha fornito un importante strumento di lotta, implicante tuttavia la presenza di costi addizionali. Uno degli aspetti più delicati in tal senso risulta valutare gli effettivi benefici conseguenti alla scelta di vaccinare in considerazione del trascurabile impatto di PCV2 che spesso si riscontra in aziende in cui vigano buone condizioni di igiene ed una valida gestione. L'evidenza che attualmente molti allevamenti siano in grado di vivere "in pace" anche con i ceppi considerati più virulenti pone l'accento sulla necessità di un approccio razionalmente

fondato sull'analisi del rapporto costo benefici, sulla scelta delle strategie di intervento e delle energie da allocare su ciascuna di queste (Madec et al., 2008). Questo dovrà essere definito caso per caso in funzione del contesto epidemiologico, della tipologia aziendale e delle risorse finanziarie, strutturali e umane disponibili.

5.2.1. Interventi gestionali

Il carattere multifattoriale di queste sindromi ha indotto a dare molto peso a questa modalità di azione che, in estrema sintesi, si concretizza come una tendenza a istituire buone pratiche di allevamento che minimizzino lo stress, la presenza di coinfezioni e altri fattori di rischio che interferiscono a vario titolo con il sistema immunitario, determinando la progressione dell'infezione a PCVD. Madec nel 2001 propose il così detto "20 point plan" per il controllo delle PCVD. A queste ci si è ispirati nel redigere le cosiddette quattro regole auree (www.thepigsite.com): I) limitare il contatto fra gli animali, II) ridurre lo stress, III) elevati standard d'igiene, IV) nutrizione adeguata (tab. 14).

La consapevolezza delle difficoltà intrinsecamente legate all'attuazione di tali regole ha portato, nel rispetto dei principi sopraccitati, a un'ulteriore classificazione, in senso gerarchico, delle azioni da intraprendere (tab. 15; tab. 16; tab. 17).

| Regola | | Spiegazione |
|--------|--------------------------------|---|
| I | Limitare il contatto fra suini | Con ciò si intende limitare sia il contatto diretto che indiretto, al fine di ostacolare la diffusione del patogeno fra animali dello stesso gruppo, di gruppi contigui o distanti. |
| II | Limitare gli stress | Animali stressati sono più suscettibili alle malattie infettive in virtù del noto effetto negativo sul sistema immunitario e in generale sulle capacità di omeostasi dell'individuo. In questo contesto l'accezione di stress non comprende solo la componente fisica o etologica ma anche la sovraesposizione a microrganismi che può determinare una eccessiva e protratta attivazione del sistema immunitario stesso. |
| III | Elevati standard di igiene | Rappresentano un elemento chiave nel contrastare in particolare la trasmissione indiretta fra animali separati fra loro sia spazialmente che temporalmente. |
| IV | Nutrizione adeguata | Una nutrizione adeguata è fondamentale non solo per la crescita ma anche per un corretto sviluppo e mantenimento della funzionalità del sistema immunitario. Particolare attenzione viene riservata alla somministrazione di anti-ossidanti e coniugati dell'acido linoleico (Grau-Roma et al., 2010). In tale contesto rientra anche la necessità di garantire un'adeguata assunzione di colostro nelle prime ore di vita. |

Tab. 14. Modificato da MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION-April 2002

| MISURE CHE DEVONO ESSERE ATTUATE | | |
|---|--------|---|
| AZIONE | REGOLA | NOTE |
| All-in/all-out | I | |
| Accurata pulizia e disinfezione | III | |
| Limitare il rimescolamento | I, II | Il rimescolamento aumenta il contatto fra animali ed è fonte di stress |
| Buona gestione del colostro | IV | Assunzione di un'adeguata quantità di colostro possibilmente entro le 6h, in ogni caso entro le 24h. Viene proposto l'uso del <i>Litter Swapping</i> dopo 3-12h (per permettere alla nidiata di poppare almeno una volta dalla madre naturale) al fine di aumentare le probabilità dei suinetti di ricevere adeguati anticorpi anti-PCV2. |
| Non effettuare <i>cross-fostering</i> dopo le 24h | I | |
| Paratie di separazione fra i box "piene" (svezzamento, ingrasso, finissaggio) | I | Finalizzato a prevenire il contatto grugno a grugno |
| Bassa densità di allevamento | I, II | Svezzamento: 3suinetti/m ² Ingrasso/Finissaggio:> 0,75m ² /suino |

Tab. 15. Modificato da MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION-April 2002

| MISURE CHE DOVREBBERO ESSERE APPLICATE | | |
|--|--------|--|
| AZIONE | REGOLA | NOTE |
| Aumentare l'accesso alle mangiatoie in svezzamento | II, IV | Raccomandati almeno 7cm per suinetto |
| Elevato controllo su temperatura e ventilazione | II | Basse temperature sono fonte di stress e depressione del sistema immunitario |
| Ridurre la numerosità nel box | I, II | Raccomandati max 13 suinetti per box o una nidiata per box |
| Evitare il taglio dei denti | I, II | Facilita trasmissione della patologia (se inevitabile vd punto seguente) |
| Mettere in atto strette misure di igiene | I, III | Nell'ambito di: taglio della coda/denti/castrazione, iniezioni. Usare strumenti monouso/sterilizzati. Usare strumentario diverso per ogni unità (specialmente sala parto). Prevedere vaschette in ingresso per la disinfezione delle calzature |
| Immunostimolazione della scrofa | IV | Incremento dell'immunità passiva di origine colostrale ottenibile con vaccinazione (Pejsak et al., 2010); proposta in passato anche esposizione a patogeno fra 80-90gg di gravidanza (molto discusso) |
| Box ospedale- pronta rimozione dei soggetti malati | I | |
| Redigere un protocollo di gestione dei soggetti malati | | Definire quando un soggetto deve essere eutanassato ed i tempi concessi per la remissione dei sintomi e il recupero. |
| Gestione adeguata degli animali morti | I | Stoccaggio in una zona isolata dell'allevamento |

Tab. 16. Modificato da MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION-April 2002

| ALTRI ELEMENTI PER I QUALI È STATO RIPORTATO UN EFFETTO POSITIVO | | |
|---|---------|---|
| AZIONE | REGOLA | NOTE |
| Dieta di buona qualità | II, IV | Importante in particolare nelle prime fasi per contrastare lo stress conseguente allo svezzamento e il calo di assunzione volontaria dell'alimento ad esso associato. |
| Sieroterapia | | Attualmente sconsigliato in quanto in contrasto con i principi della biosicurezza. Reso obsoleto dall'introduzione di vaccini (Grau-Roma et al., 2010). |
| Valutare con cura la gestione dei vaccini contro altri patogeni (animali da ingrasso) | II | Il timing delle vaccinazioni dovrebbe essere ponderato in funzione del momento in cui gli animali entrano in contatto con PCV2 al fine di minimizzare l'effetto di immunostimolazione (Grau-Roma et al., 2010). |
| Vaccinazione scrofette e scrofe | | Vaccinazione contro PRRS e PPV prima del parto al fine di aumentare i titoli anticorpali colostrali. Misura discutibile, alcuni studi hanno evidenziato un effetto predisponente della vaccinazione della scrofa nei confronti di PRRS sullo sviluppo di PCVD nei suinetti. |
| Migliorare la qualità dell'aria | | Madec propone i seguenti limiti $NH_3 < 10ppm$ $CO_2 < 0,15\%$. Minimizzare lo sviluppo di polvere. Riduce lo sviluppo di patologie respiratorie. |
| Flusso d'aria adeguato all'interno degli edifici | II | Riduce lo stress per il sistema respiratorio (vd. punto precedente). |
| Trattare scrofette/scrofe contro parassiti esterni prima del parto | II | Migliora le condizioni della fattrice con un effetto positivo sulla produzione di colostro e latte. |
| Disinfezione aerea | III | Ci sono scarse informazioni sulla reale efficacia; è tuttavia pratica comune in diversi allevamenti e anche in centri di ricerca (Iowa State University) |
| Disinfezione dell'acqua | II, III | Riduce la stimolazione del sistema immunitario e migliora l'igiene |

Tab. 17. Modificato da MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION-April 2002

Ulteriori suggerimenti sono stati poi riportati da diversi autori parallelamente al progredire delle conoscenze. In considerazione del fatto che è stata riportata l'influenza della razza e delle linee genetiche come fattori di rischio, la sostituzione dei verri è stata chiamata in causa come parte della strategia di intervento nelle situazioni più critiche. Recentissimi studi hanno enfatizzato i benefici conseguenti alla somministrazione di plasma suino atomizzato, in particolare durante la fase di svezzamento, in termini di riduzione della mortalità e dei costi associati a PCVD. La presenza di anticorpi contro PCV2 può in parte spiegarne gli effetti benefici. Tuttavia un importante ruolo viene altresì attribuito alla capacità di modulare i fenomeni di infiammazione e la funzionalità della barriera mucosale a livello intestinale (Pujols et al., 2011). Parallelamente, questo ed altri studi, hanno dimostrato come i processi produttivi siano in grado di rendere non infettive le particelle virali che pur sono riscontrabili nel plasma con metodiche di PCR.

Scarsa attenzione, almeno sotto il profilo sperimentale, è stata finora dedicata ad altre strategie di intervento quali un'accurata organizzazione del Pig Flow e l'utilizzo di strategie di acclimatamento delle scrofette (Calsamiglia et al., 2007). Un maggior approfondimento, qualora fosse seguito da risultati incoraggianti, potrebbe rappresentare un ulteriore incentivo all'attuazione di strategie in grado di determinare un miglioramento dello stato sanitario dell'allevamento nel suo complesso, limitando quindi, sia direttamente che indirettamente, l'incidenza delle PCVD.

5.2.2. Vaccini

La progressiva comparsa sul mercato, a partire dal 2004, di vaccini commerciali ha fornito un fondamentale strumento di lotta nei confronti PCVD limitando la sintomatologia nonché la circolazione virale. L'introduzione di vaccini efficaci ha definitivamente reso obsoleta la pratica della sieroterapia, assai rischiosa in termini di trasmissione di altri patogeni ed in contrasto con i principi della biosicurezza.

L'efficacia di questi prodotti commerciali ne ha determinato una rapida e ampia diffusione portando, anche nel contesto italiano, a una diminuzione della prevalenza dell'infezione e delle sue manifestazioni (Schiavon Eliana-Comunicazione personale). È tuttavia necessario sottolineare nuovamente l'importanza di non cedere alla tentazione di delegare interamente ai vaccini la "gestione" delle patologie di origine infettiva ma di associarvi un'adeguato management dell'allevamento secondo i principi brevemente elencati nel capitolo precedente. Attualmente sono disponibili cinque vaccini: Circovac® (Merial S.A.S., Lyon, France), Ingelvac® CircoFLEX (Boehringer Ingelheim, Ingelheim/Rhein, Germany), Suvaxyn® PCV2 (FortDodge Animal Health Limited, Southampton, United Kingdom), Porcilis® PCV (Intervet International BV, Boxmeer/Netherlands), e il Circumvent® PCV (Intervet/Schering-Plough

Animal Health, Millsboro, USA). È facile constatare come l'elemento condiviso da tutti i vaccini commercializzati è la presenza di *Cap* (ORF2); ciò consegue al ruolo prioritario che questa proteina svolge nell'induzione della risposta sia umorale che cellulo-mediata (tab. 18).

| Prodotto | Antigene | Registrato per | Posologia |
|---|---|---|--|
| Circovac® | PCV2 inattivato adiuvato in veicolo oleoso | Femmine sane in età riproduttiva; Suinetti dalle 3 settimane di vita | SCROFE E SCROFETTE IM Vaccinazione primaria: 2mL ripetuta dopo 3-4 sett e al massimo due settimane prima dell'inseminazione. Richiamo: al massimo due settimane prima del parto. Scrofe: due iniezioni da 2 mL separate da 3-4 settimane di cui l'ultima precedente il parto di almeno due settimane. SUINETTI: 0,5mL IM. Dose singola |
| Ingelvac® CircoFLEX | Proteina Cap espressa in baculovirus inattivato | Suinetti sani a partire dalle 3 settimane di vita | 1 ml IM. Dose singola |
| Suvaxyn® PCV2 | Chimera PCV1-PCV2 inattivato (genoma di PCV1 ad eccezione dell'ORF2 ottenuta da PCV2) | Suinetti sani a partire dalle 4 settimane di vita | 2ml IM. Dose singola oppure 1mL IM. Due dosi separate da 3 settimane |
| Porcilis® PCV | Proteina Cap espressa in baculovirus inattivato | Suinetti sani a partire dai 3 giorni di vita | 2 mL IM. Due dosi separate da 2-3 settimane |
| Circumvent® PCV | Proteina Cap espressa in baculovirus inattivato | Suinetti sani a partire dalle 3 settimane di vita | 2mL IM. Due dosi separate da 3 settimane. Se usato in animali destinati alla riproduzione va ripetuto due volte all'anno. |
| È stato riportato l'uso di vaccini stabulogeni preparati a partire da omogenati di polmone o tessuto linfoide e inattivati in formaldeide al 2%. Tuttavia attualmente è una pratica scarsamente usata (Opriessnig et al., 2007b). | | | |

Tab. 18. Schema riassuntivo dei vaccini commercialmente disponibili. Opriessnig et al., 2007b; Kekarainen et al., 2010; Kristensen et al., 2011; www.prontuariofarmaceutico.it

IMMUNIZZAZIONE SUINETTI

L'immunizzazione attiva dei suinetti nelle prime fasi di vita dà risultati assai soddisfacenti. È stato dimostrato sia in condizioni sperimentali che in condizioni di campo che la vaccinazione determina una diminuzione significativa nella prevalenza, nella durata e nei livelli di viremia cui si associa un decremento delle lesioni e della presenza di antigeni o acidi nucleici virali riscontrabili nei diversi tessuti (Kixmoller et al., 2008). Ciò si riverbera nell'ambito clinico in una netta diminuzione della morbilità, della gravità delle manifestazioni cliniche e della mortalità. È stato dimostrato come la probabilità di un animale vaccinato con una singola dose di Porcilis® PCV di presentare PCVD diminuisca di dodici volte. Concordemente a ciò i titoli riscontrati a livello sierico si mantengono tipicamente al di sotto della soglia considerata critica

per lo sviluppo di PCVD (10^7 copie/mL) (Martelli et al., 2011). Anche in presenza di concomitanti infezioni, le quali usualmente determinano un'esacerbazione della patologia, l'immunizzazione si è rivelata protettiva (Opriessnig et al., 2009a; Shen et al., 2010a; Lyoo et al., 2011). Sotto il profilo delle performances di crescita è stato dimostrato, sebbene vi sia una certa variabilità nelle stime, un aumento dell'incremento ponderale medio giornaliero stimato in 10.6 g/giorno e 41,5 g/giorno durante la fase di svezzamento e ingrasso, rispettivamente (Kristensen et al., 2011). Parte del beneficio potrebbe essere attribuibile non solo all'effetto diretto nei confronti di PCV2 ma anche al successivo venir meno dell'azione immunosoppressiva da questo indotta. Studi inerenti all'efficacia dell'espressione di ORF2 in un vettore baculovirus (Ingelvac@circoFLEX) hanno evidenziato una diminuzione della prevalenza di alcuni patogeni (PRRS e *M. hyorhinitis*) nonché della presenza di infezioni multiple a livello polmonare negli animali trattati rispetto ai controlli (Kixmoller et al., 2007). La combinazione di questi due effetti viene anche addotta come possibile spiegazione dei vantaggi dati dalla vaccinazione in allevamenti indenni da PCVD (ma non da PCV2) (Opriessnig et al., 2007a; King et al., 2008; Pejsak et al., 2010). L'effetto protettivo dipende da più fattori. Il più ovvio di questi è rappresentato dallo sviluppo di una risposta anticorpale principalmente nei confronti di *Cap*. In questa è compreso lo sviluppo di un titolo significativo di anticorpi neutralizzanti che, come precedentemente affermato, svolgerebbero un ruolo cardine nella protezione dalla PCVD (Opriessnig et al., 2009a; Lyoo et al., 2011). Uno dei principali quesiti, considerata l'elevatissima prevalenza di sieropositivi fra le fattrici, è inerente alla possibile interferenza degli anticorpi materni nei confronti dello sviluppo di un'immunità attiva da parte del suinetto. Tutti gli autori (Fort et al., 2008; Opriessnig et al., 2008; Lyoo et al., 2011; Shen et al., 2010a; Martelli et al., 2011) concordano nel negare l'esistenza di *blanketing*. Parallelamente alcuni ricercatori hanno evidenziato casi di soggetti in cui, pur non potendosi riscontrare alcuna sierconversione, si evidenziava una resistenza all'infezione equiparabile agli altri individui. Sebbene le reali motivazioni non siano completamente note, un probabile ruolo è da addursi allo sviluppo dell'immunità cellulo mediata (Kekarainen et al., 2010). Martelli et al. (2011) hanno dimostrato lo sviluppo di questa componente e, sebbene il loro studio fosse rivolto verso uno specifico vaccino, il coinvolgimento di *Cap*, elemento condiviso dagli altri prodotti, fa presumere l'estendibilità di tale evidenza. A prescindere dalle considerazioni più raffinate, studi (indipendenti) comparativi e di metanalisi rilevano una sostanziale equivalenza in termini di risultati fra i diversi vaccini (Lyoo et al., 2011; Kristensen et al., 2011). Particolare rilievo ha poi la dimostrazione di una piena protezione offerta nei confronti dei diversi tipi di PCV2, anche provenienti da diverse aree geografiche. Evidentemente sebbene per la produzione di vaccini

venga usata l'ORF2 di PCV2a gli epitopi critici in termini di immunogenicità non sono significativamente alterati dalla diversità genetica (Fort et al., 2008). Oltre a quanto riportato nella documentazione necessaria per la registrazione dei vaccini, altri autori si sono occupati dei potenziali effetti collaterali dei diversi vaccini senza riscontrare, salvo talvolta una leggera ipertermia o reazioni nel sito di inoculo, ripercussioni negative sullo stato di salute e sulle performances degli animali (Kixmoller et al., 2008; Martelli et al., 2011). Sebbene questi studi non evidenzino, nel periodo pre-esposizione a PCV2, differenze significative fra soggetti vaccinati e non, la vaccinazione è di per se stessa una manualità che presenta dei rischi e come tale la riduzione del numero degli interventi può risultare vantaggioso. Opriessnig et al. (2009a) ha evidenziato come non sussista un effettivo vantaggio nella somministrazione di una doppia dose, nemmeno nei casi in cui questa è prevista dalla posologia ufficiale. Tuttavia l'uso off-label implica un'assunzione di responsabilità che dovrà essere ponderata caso per caso ed in accordo con l'allevatore. L'ultimo elemento degno di nota è rappresentato dal riscontro di una netta diminuzione dei livelli di escrezione virale nasale e fecale. Pur non impedendola in senso assoluto, la vaccinazione riduce la probabilità di trasmissione attraverso queste vie di ben quattordici volte (Fort et al., 2008). Ovviamente ciò rappresenta un enorme vantaggio per quanto concerne il controllo dell'infezione, limitandone incidenza e prevalenza. Tuttavia l'effettiva utilità di questo strumento ai fini dell'eradicazione ed i reali costi per poter aspirare a un tale obiettivo sono ben lungi dall'essere stimati e valutati. Ulteriori studi sarebbero necessari per valutare la durata della copertura vaccinale con particolare riferimento al sistema di allevamento italiano finalizzato alla produzione del suino pesante.

IMMUNIZZAZIONE SCROFE

L'evidenza del ruolo protettivo determinato dall'immunità materna nei confronti dello sviluppo di PCVD ha spinto verso l'utilizzo della vaccinazione negli animali da riproduzione. Il rationale di questo protocollo è quello di proteggere i nuovi nati dalla massiva esposizione che può verificarsi nelle prime fasi di vita, in un periodo in cui risultano particolarmente suscettibili in funzione di un non pieno sviluppo del sistema immunitario. La capacità di persistenza del virus nell'organismo, il rapido declinare del titolo anticorpale materno e la presenza di altri fattori di rischio possono spiegare l'elevata probabilità di soggetti nati da madri viremiche e/o con bassi titoli anticorpali di sviluppare PCVD durante la loro vita (Calsamiglia et al., 2007). La vaccinazione delle scrofe permette di agire su entrambi questi punti: da un lato determina una diminuzione dei livelli di escrezione virale da parte dei soggetti adulti, dall'altro viene diminuita la suscettibilità dei suinetti inducendo il trasferimento di una più robusta immunità passiva. Un ulteriore elemento a favore di questa strategia è l'evidente vantaggio in termini gestionali. È

infatti sufficiente vaccinare la scrofa per conferire l'immunità a tutta la sua progenie, evitando nel contempo stress e manipolazioni che potrebbero favorire la trasmissione e lo sviluppo di altre patologie. Ovviamente si dovranno fornire le condizioni affinché ogni soggetto possa assumere un'adeguata quota di colostro entro il primo giorno di vita. Attualmente è disponibile un solo prodotto registrato per questa categoria di animali e sebbene in studi sperimentali siano stati utilizzati anche altri vaccini i risultati non sono stati egualmente positivi (Opriessnig et al., 2010). L'induzione ed il mantenimento di un'elevata immunità umorale (inclusa la presenza di anticorpi neutralizzanti) e potenzialmente cellulare che possa essere trasferita dalle fattrici alla progenie si è rivelata proficua, determinando una diminuzione dell'escrezione e della circolazione di PCV2 nella prima settimana di vita, migliorando lo stato sanitario, riducendo i livelli di viremia e le lesioni nei suinetti. I parametri produttivi presentano un miglioramento in termini di incremento ponderale, peso alla macellazione, durata del periodo di ingrasso ed efficienza di conversione alimentare del tutto comparabile con quello ottenibile dalla vaccinazione dei suinetti. Comparando vaccinazione delle scrofe e dei suinetti, pur non essendo evidenziabile una differenza significativa nella mortalità complessiva dalla nascita allo svezzamento, è possibile riscontrare una diversa ripartizione della stessa nei diversi periodi di vita. L'immunità materna determina una maggiore riduzione della mortalità pre-svezzamento mentre la vaccinazione dei suinetti è maggiormente influente nel successivo periodo. Ciò è spiegabile con l'inevitabile declino dell'immunità passiva che renderebbe nuovamente suscettibili gli animali (Martelli et al., 2011); tuttavia la scarsa divergenza fra i due gruppi anche nel periodo post-svezzamento lascia presumere la maggior criticità delle prime fasi di vita dell'animale e la successiva acquisizione di un'adeguata capacità di risposta attiva da parte del soggetto (Pejsak et al., 2010). Ulteriori studi dovrebbero considerare quanto questo aspetto sia influenzato dalle condizioni gestionali e ambientali dell'allevamento. L'assenza di interferenza fra immunità passiva e attiva, anche qualora siano conseguenza dell'utilizzo del medesimo antigene vaccinale, rende degna di valutazione la possibilità di vaccinare entrambi i gruppi (Opriessnig et al., 2009a; Pejsak et al., 2010). L'associazione fra disordini riproduttivi e PCV2 ha determinato un crescente interesse sull'efficacia dei protocolli vaccinali nel prevenire questa manifestazione delle PCVD. Sebbene i risultati siano ancora controversi e discussi, necessitando quindi di ulteriori approfondimenti, diverse indagini hanno fornito indicazioni sull'effettivo ruolo protettivo della vaccinazione. È stato riportato che l'immunizzazione di scrofette e scrofe al primo e secondo ordine di parto potrebbe diminuire i ritorni in estro conseguenti all'insuccesso nell'impianto. Una diminuzione significativa della natimortalità e un miglioramento del farrowing rate, associato altresì ad una diminuzione della mortalità pre-

svezzamento sono state riportate da diversi autori (Madson et al., 2009a). L'inoculazione sperimentale in scrofe vaccinate di PCV2 sia per via nasale (al 56° giorno di gestazione) che tramite seme artificialmente contaminato ha tuttavia dimostrato la mancanza di una completa protezione nei confronti dell'infezione fetale. In soggetti nati da madri immunizzate è stato infatti possibile riscontrare la presenza di viremia, anticorpi anti-PCV2 pre-colostrali, lesioni istologiche e presenza di antigene virale nei tessuti rilevabile all'IHC. Inoltre pur in presenza di anticorpi (anche neutralizzanti) sia a livello sierico che colostrale non viene meno l'escrezione di PCV2 con il colostro. Sfortunatamente negli studi sopraccitati sono stati utilizzati vaccini non registrati per i soggetti in riproduzione. Conseguentemente ulteriori prove sarebbero necessarie per estendere la validità dei risultati. In conclusione sebbene la PCV2-associated reproductive failure possa risultare meno frequente, i livelli di attenzione devono rimanere alti poiché, non venendo probabilmente prevenuta l'infezione in un rilevante numero di soggetti, questi potrebbero veicolare l'infezione nelle diverse fasi dell'allevamento (Madson et al., 2009a; Madson et al., 2009c)

6. rt-PCR

6.1. INTRODUZIONE

Lo sviluppo e l'introduzione di tecniche basate sull'utilizzo della biologia molecolare ha indubbiamente fornito un prezioso strumento per il progresso del sapere scientifico. Fra le svariate metodiche che sono riconducibili a quest'ambito l'invenzione della PCR rappresenta uno degli eventi più ragguardevoli. Sviluppata da Kary Mullis nel 1983 venne pubblicata per la prima volta nel 1985. Da allora conobbe un successo crescente in termini di riconoscimenti (Major Scientific Development- Science 1989; premio Nobel per la chimica a Mullis-1993) e pubblicazioni. Attualmente si può sostanzialmente considerare rara l'eventualità di trovare pubblicazioni scientifiche nelle quali la PCR non sia inclusa a qualche titolo nel protocollo sperimentale. Ovviamente l'ambito della diagnostica microbiologica non fa eccezione (Pestana et al., 2010). Nel 2004 Kubista et al. evidenziarono la tendenza, nell'ambito dei test inerenti la rilevazione degli acidi nucleici, al netto predominio delle metodiche basate sulla loro amplificazione che avrebbero dovuto raggiungere, negli anni a seguire, un peso pari al 75-90% del totale (Mackay, 2007). Un sempre maggior interesse si sta sviluppando attorno ad una recente evoluzione della PCR: la rt-PCR. Sebbene i primi report inerenti questa metodica risalgano al 1992, un'esponenziale aumento nel suo utilizzo si è sviluppato negli ultimi dieci anni (Deepak et al., 2007; VanGuilder et al., 2008) (fig. 6).

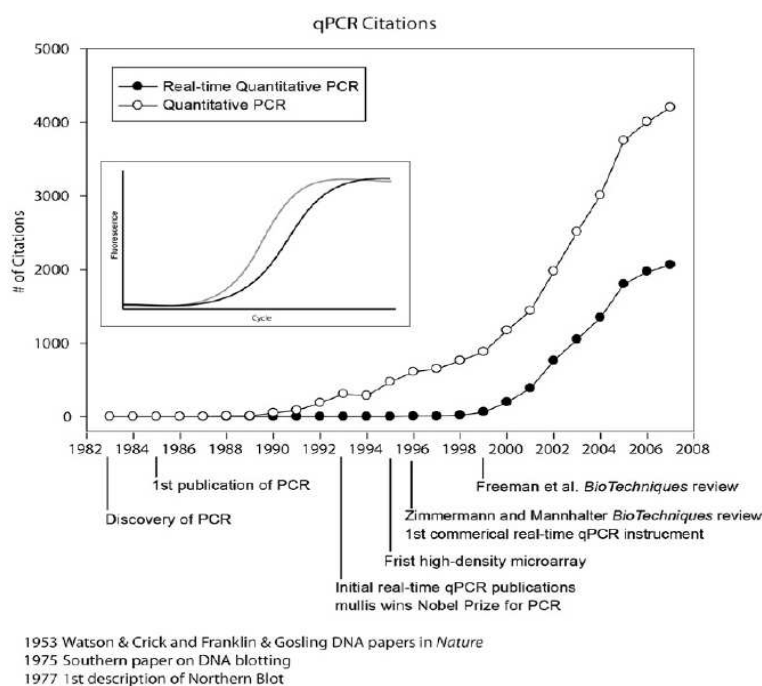


Fig. 6. Articoli in cui sono citate tecniche di PCR quantitativa. Tratta da VanGuilder et al., 2008

Metodiche rapide di amplificazione degli acidi nucleici stanno rapidamente soppiantando i test diagnostici tradizionali basati sul fenotipo. Microscopia, cultura dei patogeni, metodiche di rilevamento dell'antigene e sierologia sono spesso limitate da scarsa sensibilità o specificità, necessità di avere a disposizione microrganismi vivi e vitali in elevate quantità, difficoltà nel loro isolamento e cultura, lunghi tempi di esecuzione, costi elevati ed altro ancora. Di contro, l'analisi del patrimonio genetico può anch'essa fornire informazioni inerenti al fenotipo, quali fattori di virulenza e di resistenza, oltre a permettere una più fine tipizzazione dei diversi patogeni. Per quanto concerne la tematica dei costi questa risulta abbastanza complessa. Il calcolo di tale componente non deve infatti essere limitato ai costi diretti delle singole metodiche ma dovrebbe comprendere anche una serie di costi/benefici aggiuntivi inevitabilmente correlati ai diversi test. I tempi e le modalità di conservazione e trasporto dei campioni, i costi dei trattamenti, il dispendio in termini di manodopera necessaria alla realizzazione dei test, la presenza di eventuali limiti alla movimentazione in attesa di un responso e molti altri fattori ancora sono difficilmente quantificabili in termini pecuniari ma egualmente andrebbero considerati con attenzione. Sebbene in veterinaria non venga tipicamente considerato, un significativo valore è attribuito in medicina umana alla componente emozionale, indubbiamente condizionata da lunghi periodi di attesa per il responso. È comunque opinione generale che la rt-PCR sia vantaggiosa in termini economici in particolare in laboratori che eseguano un elevato numero di test, potendo così ammortizzare i costi e massimizzare l'efficienza (Mackay, 2007). Ovviamente come tutte le metodiche anche la rt-PCR presenta degli svantaggi. L'eccessiva specificità può talvolta andare a discapito della sensibilità determinando a volte falsi negativi in presenza di minime mutazioni del genoma. Paradossalmente anche l'eccessiva sensibilità, come precedentemente accennato, viene sovente additata come disorientante nella formulazione della diagnosi clinica. Del tutto analoghe risultano le considerazioni inerenti all'incapacità della metodica di discriminare fra l'agente infettivo infettante e la presenza del solo materiale genetico. Tuttavia preme particolarmente sottolineare come questi limiti possano essere superati dalla conoscenza delle caratteristiche di questo test diagnostico e dall'applicazione di una corretta prassi diagnostica. Questa non può dipendere interamente dalla diagnostica di laboratorio, dovendo ricercare in essa complemento e non fondamento.

6.2. PRINCIPI BASE DI PCR

L'idea alla base di questa tecnologia è estremamente semplice e consiste sostanzialmente nell'emulare in vitro i fenomeni di replicazione del materiale genetico che avvengono in vivo.

Per questo fine viene sfruttata una coppia di primer (brevi sequenze di DNA a singolo filamento), definiti senso e anti-senso, disegnati per ibridare con orientamento 5'-3' delle

specifiche sequenze del DNA target su entrambi i filamenti che lo compongono. Questi oligonucleotidi verranno successivamente sfruttati come punto di inizio per la produzione di un nuovo filamento di DNA complementare tramite l'aggiunta di desossinucleotidi da parte di polimerasi derivate da batteri termofili. L'amplificato ottenuto servirà a sua volta da stampo per l'ibridazione da parte del primer di senso opposto e la successiva replicazione. Questo processo, ripetuto un dato numero di volte, determina un incremento, teoricamente esponenziale, del numero di copie (ampliconi) della regione di DNA target compreso fra i due primer.

In estrema sintesi la PCR si fonda sulla ripetizione ciclica di variazioni termiche implicate nel determinare la diversa interazione fra i costituenti della reazione (fig. 7). Ciascun ciclo si compone essenzialmente di tre fasi: (I) fase di MELTING o DENATURATION, in cui l'aumento della temperatura oltre la T_M , determina la dissociazione dei filamenti di DNA; (II) fase di ANNEALING, in cui la temperatura viene diminuita (generalmente 5°C al di sotto della T_M dei primer) permettendo ai primer di legarsi al single-strand DNA (III) fase di EXTENSION o ELONGATION, in cui la DNA-polimerasi sintetizza il filamento di DNA complementare. La temperatura dipende dalla DNA-polimerasi usata mentre il tempo necessario è in funzione, oltre che dell'enzima, anche della lunghezza del tratto che si desidera amplificare. Alcuni protocolli possono prevedere cicli di soli due step grazie all'utilizzo di DNA-polimerasi presentanti un ampio range termico di attività. Oltre a questi passaggi può essere prevista una fase iniziale di attivazione qualora si usino delle polimerasi "hot-start". Al fine di diminuire la presenza di amplificati aspecifici, sintetizzati in condizioni di temperatura non ottimali, sono state nel tempo elaborate delle metodiche che inibiscono l'attività della polimerasi a temperatura ambiente. Queste si fondano o sul legame con anticorpi o sulla presenza di inibitori covalentemente legati all'enzima, in grado di dissociarsi da questo solo dopo un adeguato trattamento termico (tipicamente alcuni minuti a $94\text{-}96^\circ\text{C}$). Infine dopo l'ultimo ciclo di amplificazione è possibile incubare i campioni a 72°C per 5-15 minuti per assicurarsi che venga ultimata l'amplificazione dei rimanenti tratti a single-strand. In aggiunta in questa fase l'attività transferasica della polimerasi aggiunge una coda di poliA all'estremità 3' degli amplificati. Questa potrà essere poi sfruttata per alcune applicazioni in post-PCR quali la clonazione degli ampliconi in vettori T/A o U/A.

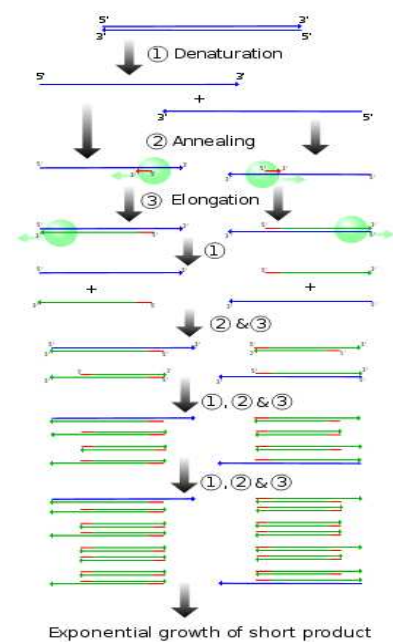


Fig. 7. Principali fasi della reazione di PCR. Tratto da www.wikipedia.org

prevedere cicli di soli due step grazie all'utilizzo di DNA-polimerasi presentanti un ampio range termico di attività. Oltre a questi passaggi può essere prevista una fase iniziale di attivazione qualora si usino delle polimerasi "hot-start". Al fine di diminuire la presenza di amplificati aspecifici, sintetizzati in condizioni di temperatura non ottimali, sono state nel tempo elaborate delle metodiche che inibiscono l'attività della polimerasi a temperatura ambiente. Queste si fondano o sul legame con anticorpi o sulla presenza di inibitori covalentemente legati all'enzima, in grado di dissociarsi da questo solo dopo un adeguato trattamento termico (tipicamente alcuni minuti a $94\text{-}96^\circ\text{C}$). Infine dopo l'ultimo ciclo di amplificazione è possibile incubare i campioni a 72°C per 5-15 minuti per assicurarsi che venga ultimata l'amplificazione dei rimanenti tratti a single-strand. In aggiunta in questa fase l'attività transferasica della polimerasi aggiunge una coda di poliA all'estremità 3' degli amplificati. Questa potrà essere poi sfruttata per alcune applicazioni in post-PCR quali la clonazione degli ampliconi in vettori T/A o U/A.

In condizioni ideali ad ogni ciclo il numero di copie della sequenza di interesse dovrebbe raddoppiare. Sfortunatamente le condizioni reali di PCR non rispecchiano queste caratteristiche o quantomeno variano al procedere della reazione. Sostanzialmente sono identificabili tre fasi: quella esponenziale, quella non esponenziale e il plateau. Inizialmente tutti i reagenti sono presenti in quantità adeguate a garantire un'elevata efficienza di replicazione che quindi si realizza in modo esponenziale, raddoppiando la quantità di DNA iniziale ad ogni ciclo. Con il progredire dei cicli le condizioni tendono a discostarsi sempre più dal contesto ideale, esitando in una minor (non esponenziale) amplificazione fino ad una sua sostanziale cessazione (plateau o end-point). I fattori chiamati in causa in questo processo sono molti, fra i più importanti ricordiamo:

- l'esaurirsi dei nucleotidi e dei primer
- l'inattivazione della DNA polimerasi (emivita di 40 min. a 95°C)
- il riallineamento dei filamenti di DNA a singolo filamento prima che i primer possano fare altrettanto
- l'eccesso di substrato (presenza di più DNA di quanto la polimerasi riesca a replicare nel tempo a disposizione)
- competizione da parte di amplificati non specifici
- accumulo di inibitori della polimerasi (es. pirofosfati)

A causa delle differenti cinetiche che si possono realizzare in ogni campione durante la PCR non sussiste una reale correlazione fra i quantitativi finali di DNA rilevabili e la quantità iniziale. Solo la fase esponenziale può essere sfruttata per estrapolare il quantitativo di partenza di DNA target (Pestana et al., 2010). Sfortunatamente le metodiche di PCR classica permettono solamente di rilevare e quantificare l'amplificato finale (end-point qPCR), risultando quindi poco accurate e, conseguentemente, in progressivo declino (VanGuilder et al., 2008). Un ulteriore limite è rappresentato dal fatto che le metodiche per la dimostrazione dell'amplificato (es. elettroforesi su gel di agarosio, Southern blot, PCR-ELISA) prevedono una processazione post-PCR che, oltre ad essere dispendiosa in termini di tempo, incrementa i rischi di cross-contaminazione fra i diversi campioni.

6.3. REAL-TIME PCR

La fondamentale differenza rispetto alle metodiche di PCR classica consiste nella possibilità di rilevare e quantificare i prodotti generati durante lo svolgersi della reazione.

Sebbene agli albori di questa metodica siano state utilizzate sonde radioattive, attualmente l'evidenziazione del procedere della reazione è ottenuta con l'utilizzo di reagenti fluorescenti. Questi sono in grado di assorbire energia luminosa fornita dallo strumento ad una data lunghezza

d'onda ed emetterla sotto forma di onde elettromagnetiche di lunghezza d'onda maggiore (parte dell'energia viene dissipata sotto forma di calore) che può essere rilevata e misurata. Questo cambiamento nella lunghezza d'onda è chiamato *Stoke shift* ed è definito come la differenza fra i picchi di assorbimento ed emissione. Una prima distinzione fra i reagenti fluorescenti può essere fatta sulla base della loro interazione, specifica o aspecifica, con l'amplificatore. Sebbene entrambe le categorie comprendano molti reagenti e metodiche, l'illustrazione di queste esula dagli scopi della trattazione e ci si limiterà quindi a quelli pertinenti allo studio sperimentale affrontato.

6.3.1. SYBR® green I

Il SYBR® green I è un agente intercalante in grado di legarsi in modo aspecifico con qualsiasi sequenza di DNA a doppio filamento. La fluorescenza emessa (picco $\lambda = 522\text{nm}$) è scarsa quando è libero in soluzione mentre aumenta di oltre 1000 volte quando legato al DNA se eccitato con onde elettromagnetiche aventi opportuna lunghezza d'onda ($\lambda = 422\text{nm}$).

Questo colorante è relativamente poco costoso, non richiede la progettazione di sonde ed è scarsamente influenzato da mismatches nucleotidici che viceversa possono impedire o quantomeno rendere meno stabile l'ibridazione di sonde marcate. La tipologia di legame che lo caratterizza non permette di discriminare, almeno in prima analisi, gli amplificati specifici da tratti aspecifici di dsDNA. Questi possono essere generati da interazioni inappropriate fra nucleotidi dello stesso primer (hairpin), di primer dello stesso senso (self-dimer) o di primer di senso opposto (cross-dimer) (Pestana et al., 2010). La formazione di primer-dimer non è evento particolarmente raro, specialmente quando la reazione entra nella fase di plateau o in presenza di scarso o assente template (Mackay, 2007). Inoltre possono pur sempre sussistere prodotti non specifici. In altre parole, poichè le performance delle PCR basate sul SYBR® green I dipendono in massima parte dalla qualità della coppia di primer scelti, possono facilmente insorgere, anche dopo l'ottimizzazione del test, elementi confondenti l'interpretazione dei dati, in particolare in presenza di limitate quantità del DNA target. Per limitare questa fonte di incertezza l'analisi della *melting curve* risulta essere uno strumento di fondamentale importanza. Quando, sotto forma di calore, viene fornita energia sufficiente si determina la rottura dei legami a idrogeno fra le basi appaiate e quindi la denaturazione della doppia elica di DNA. Ogni sequenza di DNA richiede una diversa quantità di energia in funzione di una serie di caratteristiche quali: contenuto e distribuzione di G e C, lunghezza del segmento di DNA, concentrazione del DNA e composizione del solvente in cui è sospeso. Per definizione si considera la temperatura di *melting* (T_M) come la temperatura alla quale il 50% delle copie della sequenza considerata sono denaturate (Mackay, 2007). Nella pratica lo strumento determina un progressivo aumento della temperatura e contemporaneamente misura in continuo la variazione della fluorescenza. Al

progressivo procedere della denaturazione si osserverà una parallela diminuzione della fluorescenza determinata dalla dissociazione fra dsDNA e SYBR® green I. Le curve di *melting* vengono rappresentate graficamente ponendo come variabile indipendente la temperatura e come variabile dipendente la fluorescenza. Di più agevole comprensione risultano i picchi di *melting*, ricavati dal negativo della derivata prima delle curve di *melting*. In questa rappresentazione il picco della curva si colloca in corrispondenza della T_M (fig. 8) (LightCycler®480 Instrument Operator's Manual- Software Version 1.5).

Attraverso questo processo è possibile verificare la specificità dell'amplificato in funzione delle caratteristiche di sequenza. Tuttavia possono egualmente sussistere casi in cui le T_M di amplificati diversi sostanzialmente corrispondono, rendendo difficoltosa la differenziazione (Ririe et al., 1997).

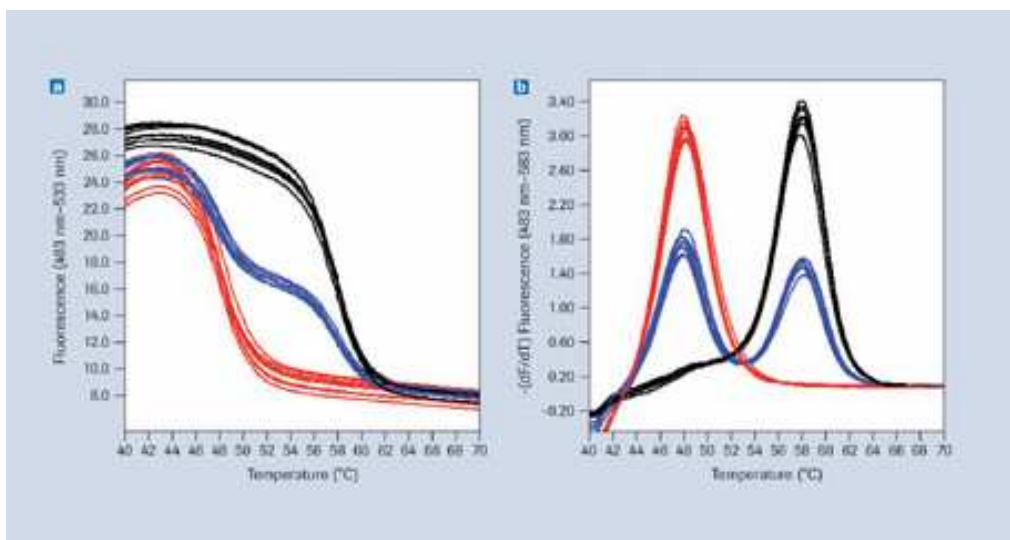


Fig. 8. Aspetto delle curve di *melting*(a) e dei picchi di *melting*(b). Tratto e modificato da Hoffmann et al., 2007

6.3.2. Sonde fluorescenti

Le sonde rappresentano sostanzialmente degli oligonucleotidi capaci di riconoscere in modo specifico una data sequenza di interesse facente parte dell'amplificato e segnalarne la produzione tramite lo sviluppo di fluorescenza. Sebbene nel corso del tempo siano state proposte soluzioni diverse, alcuni principi sono rimasti sostanzialmente immutati. La maggior parte delle oligo-probe si basano sul

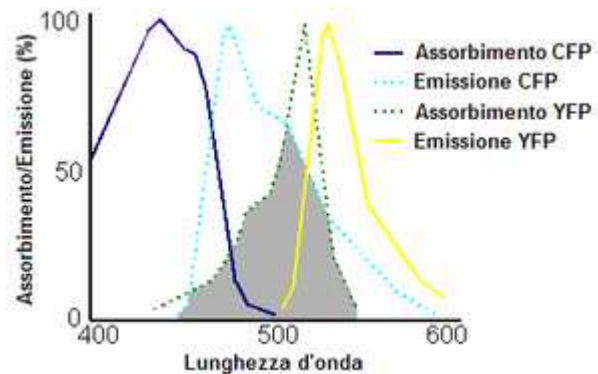


Fig. 9. Relazione fra spettri di assorbimento ed emissione di due fluorofori. Tratto da www.wikipedia.org

principio della fluorescence resonance energy transfer (FRET) fra fluorofori (F) o fra un fluoroforo e un dark o black hole, non-fluorescent quencher (NFQ). La FRET consiste essenzialmente nell'effetto combinato di due molecole in grado di emettere fluorescenza in seguito ad una eccitazione. Verso uno di questi fluorofori, detto donatore, viene diretta un'onda elettromagnetica ad una λ specifica (tipicamente, quella relativa al suo picco di assorbimento). Il donatore, eccitato, può emettere fluorescenza secondo il suo peculiare spettro di emissione. Se lo spettro di emissione del donatore si sovrappone in maniera consistente a quello di assorbimento di un accettore (se, cioè, i salti energetici associati ai due processi sono simili), il donatore eccitato non emette luce ma trasferisce l'eccitazione in maniera risonante all'accettore (in modo più o meno efficiente), che emetterà un quanto luminoso alla sua lunghezza d'onda caratteristica (fig. 9) o la dissiperà interamente sotto forma di calore qualora si tratti di un "dark" quencher. Nel primo caso la specifica λ da questa emessa può essere acquisita o meno dallo strumento a seconda delle impostazioni. Alcune metodiche sfruttano la generazione di questa nuova radiazione luminosa per evidenziare l'avvenuta amplificazione (es. hybridisation probes-HybProbe®probes). Qualora non venga registrata il secondo fluoroforo funge di fatto da quencher (Q). Come regola generale nella programmazione della reazione bisognerebbe ovviamente aspirare ad avere un rapporto segnale/rumore di fondo quanto più elevato possibile. Sempre in termini generali, questo risulta più facilmente ottenibile utilizzando dei NFQ (PCR guide-www.eurogentec.com).

Essendo il trasferimento di energia proporzionale all'inverso della sesta potenza della distanza ($\frac{1}{R^6}$) il rapporto spaziale fra F e Q risulta determinante e viene quindi sfruttato in queste metodiche.

HYDROLYSIS PROBE-TAQMAN

Le sonde a idrolisi sfruttano a pieno i principi brevemente elencati nel capitolo precedente. Queste constano di una breve sequenza nucleotidica cui sono covalentemente legati un fluoroforo (estremità 5') e un quencer (estremità 3'). Fintantoché la sonda resta integra, come si realizza in assenza di amplificazione specifica, la vicinanza fra fluoroforo e quencer impedisce l'emissione di fluorescenza. Qualora si rendano disponibili sequenze specifiche può avvenire l'ibridazione fra probe e target. Questo deve avvenire prima dell'annealing dei primer ($T_{Mprobe} > T_{Mprimer}$) e preferenzialmente in una porzione del genoma quanto più vicina possibile all'estremità 3' del primer di analogo senso. In questo modo l'attività 5'-3' esonucleasica della polimerasi "libera" rapidamente il fluoroforo che, allontanandosi dal quencer, emette una fluorescenza registrabile dallo strumento. Ciclo dopo ciclo questo processo si ripropone determinando un progressivo aumento della fluorescenza corrispondente all'incremento del numero degli ampliconi. L'utilizzo di diverse sonde marcate con fluorofori in grado di emettere in diverse regioni dello spettro permette di sfruttare questa metodica per la realizzazione di multiplex-PCR. È quindi possibile realizzare, rilevare e quantificare più reazioni di PCR che avvengono contemporaneamente nel medesimo pozzetto.

6.3.3. Quantificazione

Il monitoraggio della reazione permette di conoscerne l'andamento durante la fase esponenziale, unico momento in cui è possibile definire una correlazione fra il quantitativo di DNA (e quindi la fluorescenza) presente ad un dato ciclo e la quantità iniziale. A tal fine è necessario ricorrere all'utilizzo di curve standard, ottenute dalla diluizione seriale di un campione a titolo noto contenente la sequenza di interesse. Per poter comparare su base oggettiva i risultati ottenuti nei diversi campioni è necessario definire un momento, nell'ambito della fase esponenziale, univocamente definito per i diversi campioni. Si considera quindi il Cp (crossing point) o Ct (threshold cycle), definibile come il numero frazionale del ciclo in cui la fluorescenza emerge sopra il livello del background. Il software dello strumento utilizzato (LightCycler 480) prevede due modalità per la definizione del Cp: il metodo della seconda derivata massima (*second derivative maximum*) e quello dei Fit point. Il primo si basa sul fatto che il segnale della fluorescenza aumenta con un tasso crescente nella fase esponenziale della reazione per poi diminuire successivamente. A differenza dei metodi basati sulla comparazione con un valore soglia questo calcolo rifiuta l'idea che campioni con la medesima fluorescenza presentino il medesimo quantitativo di DNA, ritenendo più accurato considerare l'andamento della curva e in particolare il momento di massima accelerazione nell'incremento della fluorescenza. Il disturbo dato dal background viene ulteriormente eliminato calcolando la media aritmetica dei valori di

fluorescenza fra i cicli 2 e 6 e sottraendola al valore complessivo. Il secondo metodo prevede l'esclusione della fluorescenza costituente il rumore di fondo, la definizione di una threshold line e di un numero variabile (da 2 a 4) di fit point, corrispondenti a valori di fluorescenza ricavati in cicli compresi nella fase esponenziale della reazione. L'intersezione fra la log-line passante per i fit point e la threshold line definisce il Cp. Il principale vantaggio di questa tecnica è rappresentato dal fatto che permette di ottenere egualmente dei valori di Cp anche nei casi in cui le caratteristiche della curva non siano tali da permettere il calcolo della derivata seconda. Tuttavia questa opzione prevede un maggior intervento dell'operatore (pur essendo possibile sfruttare le impostazioni suggerite dal software), rendendo la metodica meno oggettiva.

Ottenuti i Cp della curva standard il programma è in grado di ricavare una retta di regressione che correli il Cp al numero di copie iniziali, espresse su scala logaritmica in base dieci. Il confronto fra questa e il Cp del campione ignoto permette di ricavarne il titolo a T₀.

L'uso di curve standard permette di ottenere contestualmente una serie di importanti informazioni ed in particolare l'efficienza di PCR.

Il numero di copie ad ogni ciclo risulta essere

$$X_n = X_0(1+E)^n \quad (1)$$

Dove X_n è il numero di copie presenti al ciclo n mentre X₀ rappresenta il numero di copie iniziali.

In condizioni ideali E (l'efficienza) è pari ad 1; conseguentemente (1) si risolve in X_n=X₀(2)ⁿ.

Per valutare l'E nelle reali condizioni della PCR è possibile sfruttare una curva standard costruita tramite diluizioni seriali in base dieci sussistendo infatti una relazione fra E e la pendenza della retta di regressione lineare.

$$E = \left[10^{-1/slope} \right] - 1 \quad (2)$$

Questa viene solitamente espressa in termini percentuali. Nella pratica l'efficienza viene considerata adeguata per livelli compresi fra il 90 e il 105% (Pestana et al., 2010).

7. SCOPO DELLA TESI

L'utilizzo della PCR in ambito diagnostico rappresenta ormai una realtà consolidata in Medicina Veterinaria grazie ai notevoli vantaggi in termini di rapidità, sensibilità e specificità. Tuttavia, a differenza di quanto si può riscontrare in medicina umana, l'utilizzo di metodiche quantitative, rappresentate primariamente dalla rt-PCR, è tutt'ora limitato e sovente confinato al contesto sperimentale. Ciò preclude importanti informazioni che sarebbero di ausilio nella pratica clinica nonché nella comprensione del reale contesto epidemiologico con cui ci sta confrontando e della sua evoluzione nel tempo. Al fine di contribuire a sanare questa lacuna è stato ideato il presente studio. In particolare si è inteso validare e confrontare due metodiche di rt-PCR, in parte desunte da precedenti studi, per la ricerca dell'acido nucleico virale a partire da tessuti. Si è cercato di ottimizzarne le performance e di valutarne le rispettive potenzialità e limiti. Il tutto è stato studiato al fine di poterne determinare l'applicabilità in un contesto diverso da quello sperimentale, in vista di una futura applicazione ai fini della routine diagnostica. I risultati ottenuti dai campioni sperimentali sono stati quindi comparati con i rispettivi esiti delle prove diagnostiche eseguite tramite immunistochemica da parte dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

8. MATERIALI E METODI

8.1. CAMPIONI

I campioni, risalenti al periodo 2007-2009, sono stati forniti, assieme ai corrispondenti referti, dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie nell'ambito della collaborazione con l'area di malattie infettive del Dipartimento di Sanita' Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria. I tessuti a disposizione erano rappresentati da: ileo, tonsille, polmone, linfonodo inguinale e mediastinico. Ciascun gruppo di campioni era associato ad un numero seriale attribuito dall'IZS, ad un identificativo proprio di ogni singolo animale all'interno del gruppo e all'indicazione dell'organo. L'insieme di queste indicazioni ne ha permesso l'associazione ai risultati della diagnostica. Nei casi in cui questa tracciabilità non fosse possibile o univoca i campioni sono stati esclusi. Durante il periodo di permanenza all'IZS, prima della processazione e successivamente in attesa dell'estrazione del DNA il materiale è stato conservato a -20°C.

Da ognuno dei campioni a disposizione, quando possibile, sono state prelevate due aliquote di 50±10mg di tessuto. La procedura è stata eseguita sotto cappa da microbiologia utilizzando strumenti sterili monouso per prevenire la cross-contaminazione fra i diversi tessuti. I campioni così ottenuti sono stati conservati a -20°C in provette con tappo a vite. A ciascuno di questi è stato associato un codice di riferimento sperimentale alfanumerico identificante l'individuo tramite un numero progressivo e la tipologia d'organo tramite una lettera (A = linfonodo inguinale, B = polmone, C = ileo, D = linfonodo mediastinico, E = tonsille). Tale codice è stato poi completato dall'indicazione dell' aliquota di appartenenza, identificata come 1 o 2. Da precedenti esperimenti erano inoltre disponibili campioni di tessuto sicuramente positivi e ad alto titolo come evidenziato da risultati dell'IHC (eseguiti all'IZS) e rt-PCR (eseguiti presso Dipartimento di Sanita' Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria).

8.2. CONSERVAZIONE REAGENTI

Tutti i reagenti per PCR e rt-PCR sono stati conservati a -20°C tranne le 2X QuantiTect Probe PCR e QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, l'RNase-Free Water e le diluizioni per le curve standard dei plasmidi 492-1-1A e P1-1C in uso che sono state conservati a 4°C.

I primer e le sonde dopo l'acquisto sono stati ricostituiti con l'RNase-Free Water ottenendo delle soluzioni 100µM. Queste sono state utilizzate per preparare le soluzioni di lavoro diluendole fino a concentrazione 10µM nel caso dei primer e di 20µM nel caso delle sonde.

Per quanto concerne i terreni di coltura, l'ampicillina e i reagenti utilizzati nella clonazione, trasformazione e selezione dei ceppi batterici sono stati rispettati i criteri imposti dai produttori.

8.3. DATABASE

È stato creato un archivio in Microsoft Access 2003 comprendente i seguenti dati di interesse al fine di permetterne una rapida visualizzazione.

- Codice IZS
- Codice di riferimento sperimentale
- Anno di origine
- Presenza di lesioni istologiche e loro descrizione (report IZS)
- Esiti batteriologici e virologici (report IZS)
- Data di estrazione
- Peso e numero dell'aliquota estratta (ed eventuale stato di scarsa idratazione)
- Data e identificativo della rt-PCR
- Metodica usata
- Risultato (positivo-negativo-dubbio)
- Cp
- Quantificazione in termini di copie del genoma virale
- N° picchi di *melting*, Tm specifica e Tm aspecifiche
- Eventuali note

8.4. PRODUZIONE DI CLONI BATTERICI CONTENENTI LE SEQUENZE DI INTERESSE DA UTILIZZARE COME STANDARD PER LA QUANTIFICAZIONE

Sono stati selezionati i campioni positivi 4699 D1-2 e D4-2 dei quali era nota la positività per PCV2 ad elevati titoli (non quantificati) e dei quali erano disponibili delle aliquote di DNA precedentemente estratte. Questi sono stati amplificati tramite PCR utilizzando il kit HotStar HiFidelity Polymerase kit (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore. A tal fine sono state utilizzate due coppie di primer 492F/492R e P1570F/ P1642R precedentemente pubblicate le cui sequenze sono riportate in tab. 19. La mix prevedeva 5x HotStar HiFidelity PCR Buffer, 2.5 units HotStar HiFidelity DNA Polymerase, primer a concentrazione 1 μ M, 5 μ L di DNA target nel caso della coppia di primer P1570F- P1642R e 2 μ L nell'altro. Il volume è stato poi portato a 50 μ L tramite l'aggiunta di acqua RNase-free. L'amplificazione è stata realizzata in 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem) alle seguenti condizioni: attivazione iniziale a 95°C per 5 min, 40 ripetizioni del seguente ciclo: 95°C per 15 sec, 60°C per 60 sec, 72°C per 30 sec seguite un passaggio a 72°C per 10 min.

| PRIMER | SEQUENZA | AUTORE |
|--------|---|----------------------|
| 492F | 5'-TATTGTTGGCGAGGAGGGTA-3' | McIntosh (2009) |
| 492R | 5'-TGGTAACCATCCCACCACTT-3' | |
| 83F | 5'-AAAAGCAAATGGGCTGCTAA-3' | |
| 83R | 5'-TGGTAACCATCCCACCACTT-3' | |
| P1570F | 5'-TGGCCCGCAGTATTCTGATT-3' | Opriessnig (2003) |
| P1642R | 5'-CAGCTGGGACAGCAGTTGAG-3' | |
| P1591 | 5'-6FAM-CCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATG-IBFQ-3' | |

Tab. 19. Primer e Probe specifici per la ORF1 di PCV2

I due tipi di amplificato ottenuti, d'ora in avanti definiti "492" il primo e "Probe" il secondo, sono stati caricati su un gel di agarosio al 2,5% in presenza di SYBR® Safe DNA gel stain 10000X e sottoposti a una differenza di potenziale costante di 100V per 30 min.

Il confronto con degli standard di peso molecolare caricati nello stesso gel ha permesso di stimare il peso molecolare dei prodotti di amplificazione ottenuti a conferma dell'effettiva specificità delle bande ottenute. Gli amplificati sono stati purificati tramite NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel), secondo le istruzioni del produttore, per poter procedere alla ligazione in pDrive Cloning Vector (Qiagen) con cui trasformare, tramite shock termico, degli *E.coli* Top10 competenti (Invitrogen). Per la realizzazione del plasmide contenente l'inserto di interesse è stato utilizzato il QIAGEN PCR Cloning Kit, seguendo le istruzioni del produttore. Con il costrutto ottenuto, sempre in osservanza dei criteri forniti dalla ditta produttrice, sono stati trasformati e quindi seminati in piastre di LB agar addizionate di ampicillina (100mg/L) e XGal gli *E. coli* competenti. Dopo incubazione a 37°C overnight si è proceduto all'identificazione dei cloni trasformati con il vettore contenente l'inserto. Questi erano distinguibili apparendo fenotipicamente come colonie bianche in quanto ampicillina resistenti ed incapaci di metabolizzare l'X-Gal. In questo modo sono state ottenute diverse colonie. A partire da queste è stato selezionato un clone per tipo di inserto. Da questo, tramite High pure Plasmid Isolation kit (Roche), seguendo le istruzioni del produttore, è stato purificato il plasmide che è stato poi sottoposto a PCR e successiva corsa su gel di agarosio secondo il protocollo precedentemente descritto. In aggiunta l'amplificato ottenuto è stato sequenziato tramite 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) utilizzando il kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit secondo le istruzioni del produttore. I cloni selezionati sono stati coltivati overnight in LB broth. A partire da 100µL di questo terreno sono stati inoculati 3 mL di LB Broth che è stato nuovamente coltivato overnight. Infine si sono inoculati, in triplicato, 100µL del terreno ottenuto in 3mL di LB Broth addizionato di ampicillina (100mg/L). Dopo crescita overnight dai 3 ml di coltura si è proceduto alla purificazione del DNA plasmidico tramite High pure Plasmid Isolation kit (Roche). Tutte le procedure sopraccitate sono state eseguite in duplicato da parte di due operatori

distinti. 2,4 mL di ciascun terreno sono stati utilizzati ai fini della purificazione del DNA plasmidico mentre; il rimanente è stato utilizzato per lo stoccaggio dei ceppi, conservati a -80 °C in PBS-glicerolo al 20%. I ceppi e i purificati ottenuti sono stati denominati secondo il principio illustrato nel sottostante diagramma (fig. 10).

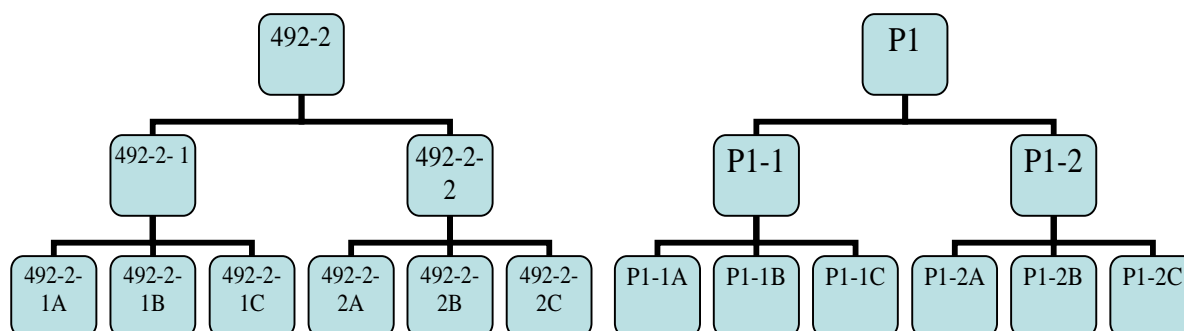


Fig. 10. Identificativo colonie per 492 e Probe

Infine gli operatori hanno quantificato il DNA plasmidico mediante lettura spettrofotometrica eseguita con lo strumento NanoDrop (NanoDrop Technologies.inc) e diluito i campioni fino ad ottenere soluzioni alla concentrazione di 1 ng/μL. Tutte le diluizioni da 1 ng/μL ottenute sono state sottoposte a rt-PCR secondo i seguenti protocolli:

Probe: è stato utilizzato il QuantiTect Probe PCR Kit; 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix, primer 1570F e 1642R 0,4μM, sonda P1591 0,1μM, 2μL di DNA target e acqua fino ad ottenere un volume complessivo di 10μL. Il ciclo termico prevedeva 15 min a 95°C, 20 cicli comprensivi di 94°C per 15sec e 60°C per 30sec al termine dei quali avveniva la lettura della fluorescenza.

492: è stato utilizzato il QuantiTect SYBR Green PCR Kit; 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, primer 83F e 83R 0,3μM, 2 μL di DNA target e acqua fino ad ottenere un volume complessivo di 10 μL. Il ciclo termico prevedeva 95°C per 15 min, 30 cicli comprendenti 15 sec a 94°C, 30 sec a 60°C, 30 sec a 72°C ed una fase di lettura di 5 sec a 60°C. A questa seguiva l'analisi della curva di *melting* ottenuta con la misurazione in continuo della fluorescenza durante l'incremento termico fra 40 e 95°C.

In precedenza diverse concentrazioni di primer e sonde erano state provate su campioni sperimentali al fine di ottimizzare le performance della PCR

Tutte le real-time PCR descritte in questa sezione sono state eseguite prevedendo un bianco (acqua al posto del DNA) e un controllo positivo (DNA estratto dal campione 4699D1pol, riconosciuto come positivo all'IHC e in precedenti test di rt-PCR).

8.5. CURVE STANDARD

Per ciascuna tipologia di test si è selezionato un estratto di riferimento rappresentato dai DNA plasmidici 492-2-1A per la metodica basata sul SYBR green I e dal P1-1C per quella basata sulla PROBE. La definizione delle curve standard è stata eseguita a mezzo di una diluizione in base dieci dei campioni compresa nel range fra 1ng/μL e 10⁻¹⁰ng/μL. La chimica della reazione corrisponde a quella appena riportata nel capitolo precedente mentre le caratteristiche del ciclo termico sono riportate in tab. 20.

| PROBE RUN PROTOCOL | | | SYBR RUN PROTOCOL | | |
|-------------------------|------------------|----------|-------------------|-----------------|----------|
| ACTIVATION | 95°C per 15 min | | ACTIVATION | 95°C per 15min | |
| DENATURATION | 94°C per 15 sec | 45 Cicli | DENATURATION | 94°C per 15 sec | 45 Cicli |
| ANNEALING/ EXTENSION | 60 °C per 45 sec | | ANNEALING | 60°C per 20 sec | |
| | | | EXTENSION | 72°C per 20 sec | |
| | | | DATA ACQUISITION | 60°C PER 2 sec | |
| | | | MELTING | 40=>90°C | |

Tab. 20. Protocolli termici di reazione

Per ciascuna diluizione del plasmide l'analisi è stata condotta in duplicato. Il numero di copie presente per nanogrammo di DNA è stato calcolato come descritto da (McIntosh et al.,2009). Il software fornito con il LightCycler 480 (LightCycler®480 Software Version 1.5) ha permesso di estrapolare la retta standard e calcolare l'efficienza della reazione.

Infine a partire dalla sospensione di DNA plasmidico originale sono state preparate e conservate a -20°C altre tre serie di diluizioni dei plasmidi 492-2-1A e P1-1C.

8.6. CONTROLLO INTERNO

Il controllo interno (IC) è stato ricavato grazie ad uno studio del 2006 (Hoffmann et al., 2006). Questo consta di un plasmide, commercialmente disponibile ad una concentrazione di 2X10⁵copie/μL (Labor Diagnostik GmbH-Leipzig), in cui è stato clonato parte del gene EGFP (formando il costrutto pGEM-EGFP2-rev), per il quale sono descritte diverse coppie di primer abbinate a sonde. Fra queste sono state scelte quelle elencate in tab. 21.

| IDENTIFICATIVO | SEQUENZA |
|----------------|--------------------------------------|
| EGFP-1-F | 5'-GACCACTACCAGCAGAACAC-3' |
| EGFP-2-R | 5'-GAACTCCAGCAGGACCATG-3' |
| EGFP-Cy5 | 5'Cy5-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-IBRQ-3' |

Tab. 21. Primer e Probe relative al controllo interno (Hoffmann et al., 2006)

In primo luogo si è valutato il ΔG associato alla formazione di possibili cross-dimer fra gli oligonucleotidi sopraccitati e quelli utilizzati nelle reazioni diagnostiche mediante il software Oligo Analyzer. Si è poi proceduto a effettuare una diluizione in base dieci dell'IC fino ad ottenere una sospensione contenente 2 copie/ μL . L'intera scala è poi stata sottoposta a rt-PCR sfruttando il QuantiTect SYBR Green PCR Kit seguendo il medesimo protocollo descritto precedentemente (tab. 20) utilizzando i primer specifici (0,3 μM) al fine di individuare una quantità di controllo interno le cui curve di amplificazione salissero con un C_p compreso fra 30 e 35 cicli.

La successiva integrazione del controllo interno alle reazioni diagnostiche è stata ottimizzata saggiando diverse condizioni di reazione che venivano valutate confrontando le efficienze di PCR, calcolate attraverso la creazione di rette standard a partire dalle diluizioni seriali in base 10 dei relativi DNA plasmidici. In particolare per quanto concerne la metodica SYBR il seguente protocollo è stato applicato su una scala di diluizioni base dieci da 1ng/ μL fino a 10^{-10} ng/ μL del plasmide 492-2-1A. La curva standard in presenza del IC è stata definita alle seguenti condizioni: QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, primer 83F e R 0,3 μM , primer EGFP-1-F e EGFP-2-R 0,15 μM , 4 copie/ μL di IC, 2 μL di DNA target e H_2O RNase-free fino ad ottenere un volume finale di 10 μL . La reazione è stata condotta usando il protocollo SYBR RUN PROTOCOL (tab. 20)

Non dissimilmente si è proceduto per quanto concerne la metodica PROBE. Sulla scala di dieci diluizioni in base dieci del plasmide P1-1C è stato utilizzato il protocollo già descritto precedentemente per il QuantiTect Probe PCR Kit: QuantiTect Probe PCR Master Mix, primer 1570F e 1642 R 0,4 μM , primer EGFP-1-F e EGFP-2-R 0,4 μM , P1591 0,1 μM , ProbeEGFP 0,4 μM , 20 copie/ μL di IC, 2 μL di DNA target e H_2O RNase-free fino ad ottenere un volume finale di 10 μL . La reazione è stata condotta utilizzando il PROBE RUN PROTOCOL (tab. 20).

Si sottolinea come tutti gli esperimenti necessari alla definizione delle curve standard siano stati condotti in duplicato ed in ognuno fosse prevista la presenza di un bianco.

8.7. ESTRAZIONE DEL DNA DAI CAMPIONI DI TESSUTO

I campioni conservati sono stati scongelati e sottoposti a estrazione del DNA utilizzando il DNeasy®Blood & Tissue Kit (Qiagen). Rispetto al protocollo consigliato dalla ditta produttrice sono state previste alcune modifiche. In primo luogo al posto dei 25mg di tessuto consigliati ne sono utilizzati 50mg. Dopo l'aggiunta di 180 μL di Buffer ATL e 200mg di 1mm zirconia/silica beads (BioSpec Products Inc) i campioni sono stati triturati tramite Hybaid RiboLyzer (quattro cicli di 20 sec alla massima velocità). Successivamente l'omogenato è stato addizionato con 20 μL di proteinasi K, mescolato al Vortex ed incubato a 56°C overnight. Si è proceduto quindi

all'aggiunta Buffer AL (200µL) ed etanolo (200µL) secondo quanto riportato nelle istruzioni. A partire dal volume complessivo (650µL) si sono prelevati, per ogni campione, 325µL al fine di caricare sulla colonnina un quantitativo di materiale equivalente ai 25mg di tessuto consigliati, evitando di saturarla. La restante parte è stata conservata a -20°C. Il protocollo consigliato dal produttore è stato seguito pedissequamente nelle successive fasi. Ogni giornata sono stati estratti ventiquattro campioni, divisi in due gruppi di dodici unità. Per ciascuna dozzina, processata in momenti temporalmente distinti, è stata conservata un'aliquota di 25µL del Buffer AE utilizzato in fase di eluizione dell'acido nucleico. Ciascuna provetta contenente l'estratto è stata identificata univocamente e conservata a -20°C.

Sono state altresì eseguite una serie di prove finalizzate a conoscere l'efficienza di estrazione. Campioni di polmone e linfonodo sono stati sottoposti, in triplicato, ad estrazione secondo la comune routine; subito dopo l'aggiunta del Lysis Buffer a ciascun omogenato è stata inoculata una quantità nota di IC, pari a 4×10^5 copie. Ultimato il protocollo gli estratti sono stati testati tramite la metodica PROBE. Al fine di stimare le perdite associate alla fase di estrazione si sono diluiti in 200µL di AE Buffer 2×10^5 copie di IC. La soluzione ottenuta è stata analizzata in triplicato assieme alle precedenti ed i risultati analizzati mediante ANOVA ad una via.

BUFFER AE

Tutte le aliquote di Buffer AE conservate al termine di ogni tornata di estrazioni sono state valutate con ambedue le metodiche. In caso di positività anche ad una sola di queste tutti i campioni corrispondenti sono stati nuovamente estratti sfruttando la seconda aliquota di tessuto e testati con entrambi i test.

Al fine di evidenziare un'eventuale contaminazione del Buffer AE utilizzato sono stati analizzati, con ambedue le metodiche, i residui dei Buffer AE ancora presenti nei tre kit utilizzati per l'estrazione nonché un Buffer AE inutilizzato e dei bianchi. Di ciascuno di questi sono stati eseguiti cinque replicati.

8.8. VALIDAZIONE

Si è previsto di eseguire, ispirandosi a quanto previsto dall'OIE Terrestrial Manual 2010, una serie di prove al fine di valutare il LOD, la sensibilità e specificità analitica nonché la ripetibilità intra ed inter-operatore caratteristiche della metodica. È stato quindi deciso di analizzare delle diluizioni scalari in base dieci di tessuto (polmone e linfonodo inguinale) positivi in corrispondenti matrici ottenute da animali negativi. I positivi sono stato ottenuti da tessuti congelati, precedentemente riconosciuti come positivi sia in IHC che in rt-PCR. I tessuti negativi sono stati prelevati da soggetti risultati sieronegativi sia per quanto concerne le IgM che le IgG. I tessuti, dopo essere stati omogenati in PBS 1%, sono stati utilizzati per la preparazione delle

diluizioni del campione positivo. Il range si estendeva dal campione non diluito fino a una concentrazione di positivo pari a 10^{-9} quella iniziale. Inoltre è stato previsto un NTC. Per ciascuna di queste, a partire da 200 μ L di omogenato addizionati di 2×10^5 copie di IC, sono state eseguite tre estrazioni da parte di due operatori differenti utilizzando il DNeasy®Blood & Tissue Kit (Qiagen). Ciascun estratto così ottenuto è stato testato in rt-PCR dai due operatori. Individuate diluizioni corrispondenti a titoli elevati, medi e bassi queste dovevano essere nuovamente estratte in triplicato e testate da due operatori in due giornate distinte. Una successiva fase doveva prevedere l'analisi della specificità analitica sottoponendo patogeni diversi da PCV2 ad analisi tramite le due metodiche comparate.

8.9. SPECIFICITÀ : PCV1 vs PCV2

A partire da una linea cellulare PK-15 è stato estratto il DNA tramite DNeasy®Blood & Tissue Kit (Qiagen). Si è quindi eseguita una PCR utilizzando diluizioni seriali in base 10 dell'estratto. A tal fine è stata utilizzata la coppia di primer PCV1F (5'-CTCGGCAGCGTCAGTGAAAA-3') e PCV1R (5'-AAATTACGGGCCCACTGGCT-3') tratta da (Kim et al., 2003b). La reazione è stata eseguita in 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem) utilizzando il KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems) secondo le istruzioni del produttore. La specificità è stata indagata eseguendo in parallelo la medesima PCR su campioni sperimentali 4699D4-1, riconosciuti come altamente positivi a PCV2. Gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. A partire dalle diluizioni dell'estratto di PK-15 è stata eseguita una rt-PCR secondo il protocollo PROBE usualmente utilizzato per i campioni sperimentali. Successivamente sono state eseguite delle prove, mantenendo immutate le caratteristiche della mix di reazione, aumentando la temperatura di annealing/extension fino ad un massimo di 65°C. Mantenendo quest'ultima impostazione si è realizzata una nuova curva standard per il plasmide P1-1C e ne sono state valutate le performance. In aggiunta sono stati selezionati quindici campioni sperimentali precedentemente analizzati, rappresentativi di titoli alti, medi e bassi (quest'ultimi negativi in SYBR). I risultati ottenuti con il nuovo protocollo sono stati confrontati con i vecchi tramite T-Student's test a due campioni accoppiati. In tutti i casi è stato verificata la positività del IC. Infine si è realizzata una rt-PCR ponendo nel medesimo pozzetto 1 μ L di DNA target di ambedue i patogeni. Questa è stata eseguita applicando sia il vecchio che il nuovo protocollo PROBE. Nello specifico sono stati definiti due gruppi di reazioni; nel primo un quantitativo fisso di PK-15 è stato miscelato ad una diluizione scalare in base dieci dell'estratto di un campione sperimentale (4699D4-1), nel secondo un quantitativo fisso di 4699D4-1 è stato mescolato ad una diluizione scalare, sempre in base dieci, di estratto derivante da PK-15. Nello specifico quantitativi fissi ammontavano a 10^{-1} la concentrazione tal

quale del 4699D4-1 e a 10^{-5} la concentrazione iniziale delle PK-15 (corrispondente alla diluizione più alta alla quale era osservabile l'amplificazione del IC). Come termine di confronto, sulla stessa piastra sono state analizzate le medesime scale di diluizione sostituendo uno dei due target con 1 μ L di H₂O. I dati ottenuti dall'applicazione dei diversi protocolli sono stato confrontati tramite T-Student's test a due campioni accoppiati.

8.10. REAL TIME-PCR SUI CAMPIONI SPERIMENTALI

Tutti gli estratti ottenuti sono stati sottoposti a rt-PCR avvalendosi del LightCycler® 480 (Roche). A tal fine sono state utilizzate piastre LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 white o, qualora non fossero disponibili, delle piastre Frame Star 480-4titude dichiarate compatibili dal produttore. Ciascun esperimento prevedeva, oltre ai campioni sperimentali, la presenza di un bianco, di un controllo positivo e di un punto della curva standard precedentemente salvata. Nello specifico è stata utilizzato come standard un quantitativo complessivo di $4,26 \times 10^4$ copie per il plasmide 492-2-1A e $4,72 \times 10^4$ copie/ μ L nel caso del plasmide P1-1C. Il volume finale di reazione è stato impostato a 10 μ L comprensivi dei 2 μ L rappresentati DNA target. Per l'interpretazione dei dati si è sfruttato il software LightCycler®480 Software Version 1.5. In primo luogo il programma ha permesso di definire come positivi, negativi o dubbi i campioni. Parallelamente lo strumento ha eseguito la quantificazione assoluta confrontando il Cp di ciascun campione con il Cp del campione a titolo noto facente riferimento alla curva standard "esterna" calcolata in presenza o in assenza di IC rispettivamente nel caso della metodica PROBE e SYBR.

Ciascun estratto è stato analizzato in singolo applicando i seguenti protocolli.

PROBE: 2X QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen), 0,4 μ M primer P1570F e 1642R , 0,1 μ M sonda P1591, 0,4 μ M primer EGFP-1-F e EGFP-2-R, 0,4 μ M Probe EGFP, 20 copie/ μ L IC DNA. È stato utilizzato il ciclo termico PROBE RUN PROTOCOL (tab. 20).

Per ciascun campione è stato inoltre valutata la positività del IC per l'identificazione di falsi negativi dovuti ad inibizione.

SYBR: 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 0,3 μ M primer 83F e 83R. È stato utilizzato il ciclo termico SYBR RUN PROTOCOL (tab. 20).

In aggiunta a quanto già riportato la specificità dell'amplificato è stata definita dall'analisi della curva di *melting*.

Tutti i campioni risultati dubbi sono stati saggiati nuovamente raddoppiando il quantitativo di DNA o effettuando due diluizioni in base dieci del campione iniziale a seconda di quanto suggerito dalle caratteristiche morfologiche della curva. Queste modifiche sono state considerate al momento del calcolo del quantitativo di DNA iniziale. I campioni testati con la metodica Probe che risultavano “inibiti”, ossia caratterizzati da assenza di positività sia per quanto concerne il DNA target che l’IC, sono stati testati una seconda volta.

Infine si è provveduto a esprimere il titolo virale in termini di copie/mg di tessuto. In questa fase il risultato finale è stato moltiplicato per un fattore 2 al fine di considerare la diversa natura del DNA plasmidico e virale, rispettivamente ds DNA e ssDNA.

8.11. CAMPIONI SPERIMENTALI: ANALISI STATISTICA

Ai fini della comparazione e della valutazione delle diverse metodiche sono stati eseguiti dei test statistici utilizzando il software SPSS (SPSS rel 12.1.1., Chicago Inc. - IL). Il grado di accordo fra le diverse metodologie e tra le differenti matrici è stato valutato calcolando il Cohen's kappa coefficient secondo la classificazione proposta da Landis JR et Koch GG., (1977) (tab. 22). La normalità nella distribuzione dei dati è stata valutata

| K | ACCORDO |
|-----------|----------------|
| 0-0,20 | LIEVE |
| 0,21-0,40 | DISCRETO |
| 0,41-0,60 | MODERATO |
| 0,61-0,80 | SOSTANZIALE |
| 0,81-1 | PERFETTO |

Tab. 22. Classificazione del Cohen's kappa coefficient secondo Landis et Koch

tramite il test non parametrico di Kolmogorov-Smirnov. Constatata l’assenza di tale condizione, la differenza nei titoli virali in funzione della positività o negatività all’IHC è stata analizzata utilizzando il test non parametrico U di Mann-Whitney. Il test non parametrico H di Kruskal-Wallis è stato invece utilizzato per valutare la presenza di differenze significative tra i titoli virali in funzione delle matrici analizzate, sempre in funzione del risultato all’IHC. Quando è stata riscontrata una differenza significativa, le varie coppie di matrici sono state confrontate con il test non parametrico U di Mann-Whitney. Il medesimo approccio analitico è stato ripetuto per entrambe le metodiche di rt-PCR. Al fine di ottimizzare le performance, assumendo come Gold standard l’IHC, sono state generate delle curve ROC onde definire dei cut-off che massimizassero sensibilità e specificità. Tale analisi è stata eseguita sia considerando la popolazione nel suo complesso che i sottoinsiemi rappresentati dalle singole matrici.

La soglia di significatività statistica è stata settata per valori di $p < 0,05$.

9. RISULTATI E DISCUSSIONE

9.1. PRODUZIONE DI CLONI BATTERICI CONTENENTI LE SEQUENZE DI INTERESSE DA UTILIZZARE COME STANDARD PER LA QUANTIFICAZIONE

La procedura di clonazione ha permesso di ottenere un numero limitato di colonie rispondenti fenotipicamente alle caratteristiche desiderate. Al fine di evidenziare l'integrazione dell'inserto di interesse, il plasmide ottenuto dai cloni prescelti è stato sottoposto a PCR ed i prodotti di amplificazione discriminati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio. Il confronto con gli standard di peso molecolare ha consentito di stimare la lunghezza dell'amplificato e constatare l'effettiva corrispondenza con la reale lunghezza dell'inserto. Questa è stata ottenuta utilizzando il programma BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) calcolando il numero di basi comprese fra i due primer sommate all'estensione dei primer stessi. In particolare l'inserto "Probe" e "492" comprendevano rispettivamente 71 e 492 bp. Sebbene sia stato utilizzato il kit HotStar HiFidelity Polymerase kit-Qiagen, presentante una DNA Polimerasi Proofreading, si è egualmente ritenuto opportuno sequenziare la regione del plasmide ("Probe" e "492") comprendente l'inserto al fine di evidenziare eventuali mutazioni insorte nella duplicazione del materiale genetico. Il confronto tramite BLAST fra queste e le sequenze presenti nei database sfruttati dal programma ha permesso di confermare l'effettiva specificità dell'inserto e l'assenza di polimorfismi di sequenza fra i primer in uso e le corrispondenti regioni dell'amplificato. Si è quindi proceduto con l'estrazione del DNA plasmidico ottenendo sospensioni adeguate in termini di concentrazione e purezza, come testimoniato da rapporti 260/280 e 260/230 superiori rispettivamente a 1,8. e 2. Misure significativamente inferiori vengono considerate indice di contaminazione (Nanodrop-Technical Support bulletin; ©2007 NanoDrop Technologies, Inc). Partendo dalle diluizioni 1ng/μL sono state eseguite delle rt-PCR. È stato possibile constatare che i campioni erano caratterizzati da Cp analoghi (fig. 11; fig. 12). Questo ha permesso di affermare sia che le diverse popolazioni batteriche utilizzate presentavano con costanza il plasmide con l'inserto di interesse sia che il processo di estrazione del DNA plasmidico, quantificazione e successiva diluizione erano ripetibili e quindi che era possibile utilizzare la sospensione di DNA plasmidico come standard per la quantificazione. In caso contrario, qualora l'integrazione e la trasformazione avessero interessato solo una percentuale variabile di batteri o le procedure di estrazione, quantificazione e diluizione del DNA plasmidico non fossero state ripetibili intra- ed inter-operatore si sarebbero ottenuti Cp differenti. Nel caso dei plasmidi "Probe" il Cp si è attestato a valori medi di 9,80 Cp con una deviazione standard di $\pm 0,79$. I plasmidi "492" si sono invece attestati a valori di $10,3 \pm 0,44$.

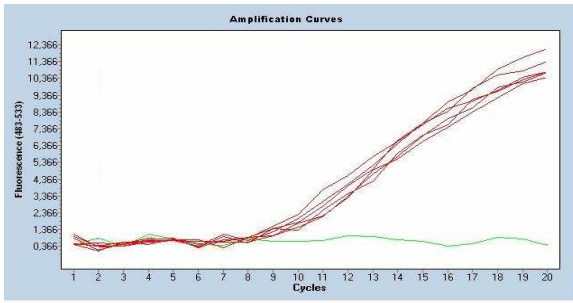


Fig. 11. Curve di amplificazione dei plasmidi "Probe" 1 ng/μL

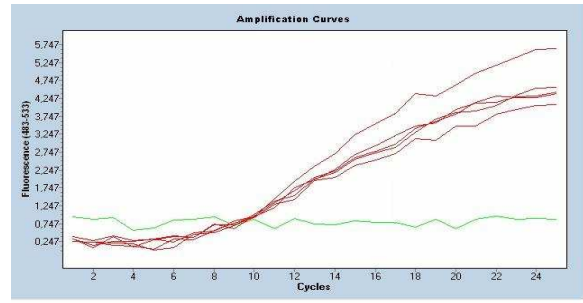


Fig. 12. Curve di amplificazione dei plasmidi 492 1 ng/μL

9.2. CURVE STANDARD

L'esecuzione di diversi esperimenti su vari campioni sperimentali di cui era nota la positività o negatività ha permesso di definire le caratteristiche iniziali della miscela di reazione, dalle quali si è partiti per la successiva ottimizzazione. Si è quindi proceduto allo sviluppo delle curve standard.

In primo luogo è stato calcolato il peso del singolo plasmide secondo quanto descritto da McIntosh (2009). In estrema sintesi viene assunto che ogni mole di bp di DNA pesi 650g, ciò permette di ricavare il peso di una mole di plasmide e conseguentemente il numero di moli in un nanogrammo. Moltiplicando per il numero di Avogadro si ottiene il numero di plasmidi per ng. Questi sono risultati essere $2,36 \times 10^8$ per la "Probe" e $2,13 \times 10^8$ per il "492". Successivamente, in sede di analisi dei campioni sperimentali, tenendo conto della diversa natura del DNA virale (ssDNA) e plasmidico (dsDNA), si è moltiplicato per un fattore due il risultato appena ottenuto (Mackay, 2007).

Il protocollo definitivo utilizzato per la realizzazione delle curve è stato scelto in virtù di una serie di prove eseguite utilizzando diversi quantitativi di primer e probe. Nella scelta si sono considerate le performance ed i costi (risparmio in termini di reagenti). Delle curve ottenute si è valutato il LOD (Limit of detection), il range di linearità della relazione fra C_p e logaritmo della concentrazione, l'efficienza e l'errore.

Per quanto concerne la metodica PROBE si è ottenuto un LOD pari a 4,72 copie per reazione (corrispondenti a un C_p di $37,83 \pm 0,15$) mentre la porzione lineare della curva standard si estendeva fra $4,72 \times 10^8$ e $4,72 \times 10^0$. L'efficienza in questo range risultava del 95,4% con un errore pari a 0,043 (fig. 13). Come precedentemente riportato l'efficienza è da ritenersi adeguata (Pestana et al., 2010) così come l'errore, per il quale il manuale dello strumento riporta come accettabili valori inferiori a 0,2. La metodica basata sul SYBR ha evidenziato LOD pari a $4,26 \times 10^1$ copie di plasmide per reazione (corrispondenti a un $C_p >$ di 40) ed un range di linearità compreso fra $4,26 \times 10^6$ e $4,26 \times 10^1$. L'efficienza entro questo range è risultata del 84,9 % e

l'errore pari a 0,0354 (fig. 13). In aggiunta sono stati valutati i picchi di *melting* constatando come questi fossero tutti specifici con due sole eccezioni rappresentate dalle diluizioni $4,26 \times 10^8$ e $4,26 \times 10^1$ nelle quali si evidenziava anche un picco aspecifico. Tuttavia l'area compresa sotto la curva corrispondente all'amplificato specifico è risultata rispettivamente 5,4 e 7 volte maggiore della precedente.

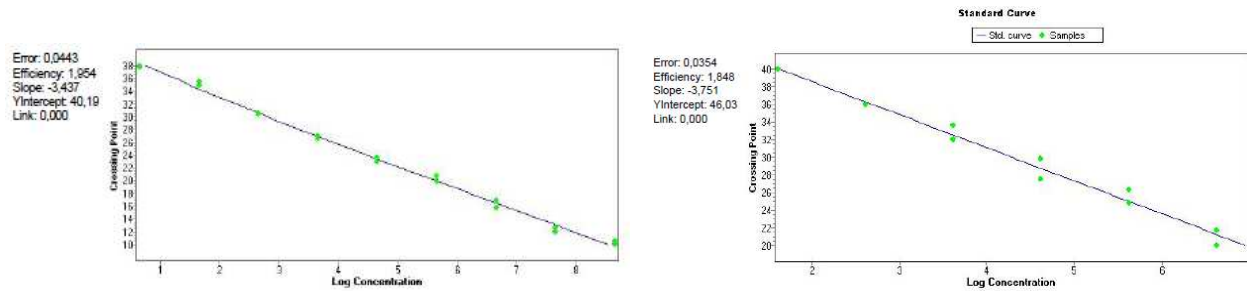


Fig. 13. Curve standard inerenti la metodica PROBE (a sinistra) e SYBR (a destra)

Nonostante limitando ulteriormente l'intervallo considerato come lineare si possano ottenere performance leggermente migliori si è preferito mantenere un range più ampio al fine di non precludere la quantificazione di titoli virali potenzialmente di interesse nella valutazione dello stato clinico dell'animale. Sebbene una quantificazione accurata si possa ottenere solamente entro i sopraccitati limiti il riscontro di titoli superiori o inferiori permette egualmente di definire in senso qualitativo l'entità dell'infezione.

9.3. CONTROLLO INTERNO

L'analisi *in silico* della compatibilità della coppia di primer-sonde per l'amplificazione del controllo interno con quelle utilizzate per le reazioni diagnostiche (PROBE e SYBR), ottenuta valutando la variazione di energia libera associata alla loro interazione, ha dato risultati soddisfacenti, mantenendosi al di sotto delle 5 Kcal/mol. L'amplificazione del solo IC ha permesso di valutare le caratteristiche del sistema (tab. 23) ed ha fornito il substrato per le successive prove. Per ciascuna metodica sono state quindi provate diverse concentrazioni di plasmidi e/o primer inerenti il controllo interno. Nella scelta della migliore concentrazione dei reagenti sono stati considerati, per quanto concerne l'analisi del DNA virale, il LOD, il range di linearità della relazione fra

| PERFORMANCE | |
|-------------|---------------------|
| LOD | 2 copie/μL (1 di 2) |
| RANGE | 20000-2 copie/μL |
| E(%) | 108,6 |
| Errore | 0,0949 |
| Tm | 87,07±0,17 |

Tab. 23 Performance inerenti l'IC

Cp e concentrazione di DNA target, l'efficienza e l'errore associati alla curva standard. È stato altresì valutato il Cp dell'IC e l'eventuale interferenza determinata dalla concentrazione di uno dei due DNA target nei confronti dell'amplificazione dell'altro.

9.3.1. Probe

Per quanto riguarda la metodica basata sulla Probe si sono ottenuti risultati soddisfacenti (tab. 24).

| N° copie IC/ μ L | 200 | 20 | 4 |
|----------------------|---|---|---|
| LOD | $4,72 \times 10^0$ (1 di 2) $C_p=37,32$ | $4,72 \times 10^{-1}$ (1 di 2) $C_p=37,07$ | $4,72 \times 10^{-1}$ (1 di 2) $C_p=37,05$ |
| RANGE | $4,72 \times 10^8$ - $4,72 \times 10^1$ ($r = -0,999$ $r^2 = 0,999$) | $4,72 \times 10^8$ - $4,72 \times 10^0$ ($r = -0,999$ $r^2 = 0,999$) | $4,72 \times 10^8$ - $4,72 \times 10^0$ ($r = -0,998$ $r^2 = 0,997$) |
| E(%) | 91,1 | 92,4 | 93,7 |
| Errore | 0,06 | 0,0134 | 0,162 |
| C_p IC | $26,98 \pm 1,18$ | $30,88 \pm 1,59$ | $33,92 \pm 0,98$ |
| Conc. Target | $4,72 \times 10^3$ | $4,72 \times 10^3$ | $4,72 \times 10^2$ |

Tabella 24. LOD = Limit of detection; RANGE = parte della curva standard in cui sussiste una relazione lineare fra logaritmo della concentrazione di DNA target e C_p ; E= efficienza; C_p = C_p inerente all'IC calcolato come media e deviazione standard; Conc. Target = Concentrazione massima di DNA plasmidico "Probe" alla quale risulta rilevabile l'amplificazione dell'IC.

Una delle principali preoccupazioni era rappresentata dalla possibile competizione fra il DNA target e il controllo interno. Effettivamente una diminuzione del LOD, del RANGE e dell'efficienza sono riscontrabili in presenza di concentrazioni più elevate di IC. In funzione di queste evidenze si è scelto di includere nella miscela di reazione un quantitativo di IC pari a 20 copie/ μ L. La scarsità di substrato, come nel caso delle 4 copie/ μ L, sfavorisce l'amplificazione del IC poiché reagenti ed enzimi vengono in parte sottratti dal plasmide "Probe". Ciò esita nel mancato rilevamento del IC per concentrazioni dell'altro plasmide superiori a $4,72 \times 10^2$. In realtà questo riscontro non invalida di per se la metodica. L'utilizzo di un controllo interno è finalizzato ad evidenziare l'eventuale inibizione della PCR. Esistono infatti diversi composti, organici e non, che a vario titolo possono interferire con il procedere della reazione (tab. 25).

| Fattori influenzanti la PCR | |
|-------------------------------|--|
| Inibitori | Enhancer |
| Hemoglobin, Urea, Heparin | DMSO, Glycerol, BSA, Formamide, PEG, TMANO, TMAC |
| Organic or phenolic compounds | Special commercial enhancers, Gene 32 protein, TaqExtender, Perfect Matchr |
| Glycogen, Fats, Ca^{2+} | <i>E. coli</i> ss DNA binding protein |
| Tissue matrix effects | |
| Laboratory items, powder, etc | |

Tab. 25. Elementi in grado di condizionare il procedere e l'efficienza della reazione. Tratto e modificato da Deepak et al., 2007.

Conseguentemente può sorgere il dubbio che taluni campioni risultati negativi siano il frutto dell'inibizione dei processi di amplificazione. Per poter affermare l'assenza di questi fenomeni è

sufficiente che uno dei due amplificati risulti positivo. Qualora si tratti dell'IC si può considerare negativo il campione sperimentale, se invece questo risulta positivo ma non il controllo interno è possibile egualmente assumere l'assenza di inibizione e giustificare la mancata amplificazione dell'IC con la competizione per i reagenti. Il riscontro che il controllo venga amplificato solo in presenza di concentrazioni relativamente basse ($4,72 \times 10^2$) di plasmide "probe", e presumibilmente DNA virale, non dovrebbe rappresentare un problema in quanto questa concentrazione rientra nel range di detection della metodica e come tale in assenza di inibizione si osserverà l'amplificazione del campione sperimentale. Tuttavia, in considerazione del fatto che la concentrazione di IC si approssimava al LOD inerente a questa componente, si è preferito utilizzare un maggior quantitativo ($20 \text{ copie}/\mu\text{L}$) al fine di diminuire il rischio di segnalare false inibizioni. Infatti, esaminando il controllo interno nei campioni sperimentali presentanti titolo minore di $4,72 \times 10^3$ (negativi esclusi) si è riscontrata la positività dello stesso nel 95,2% dei casi. A ulteriore sostegno di questa scelta si è altresì considerata la sostanziale uguaglianza in termini di performance per quanto concerne il DNA target (tab. 24).

9.3.2. SYBR Green I

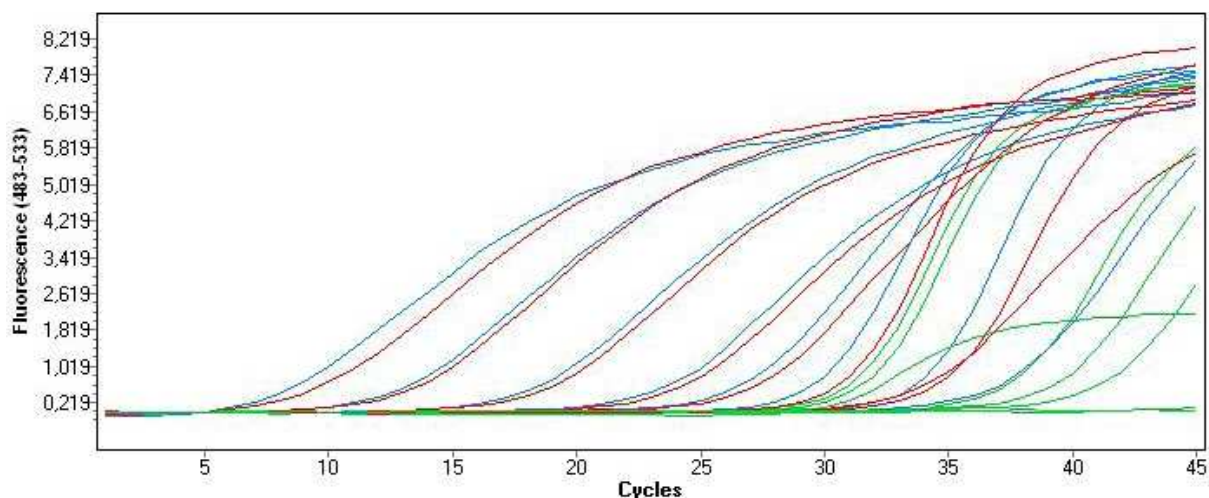


Fig. 14. Curva standard della metodica SYBR in presenza di IC. Al diminuire della concentrazione del DNA plasmidico si osserva il crescente contributo, in termini relativi, della fluorescenza determinata dall'IC che si manifesta come una diminuzione della distanza fra le curve.

Nell'ambito dell'ottimizzazione della metodica SYBR si è cercato di perfezionare la miscela di reazione variando la concentrazione di primer e plasmide IC. L'obiettivo finale era quello di minimizzare l'amplificazione dell'IC limitandola solamente ai campioni a bassa concentrazione di plasmide "492" e, conseguentemente, DNA virale. Le metodiche basate sull'uso di SYBR GREEN I non si prestano particolarmente all'esecuzione di multiplex PCR in quanto si fondano sull'uso di una molecola fluorescente in grado di interagire con tutti i filamenti di dsDNA. Conseguentemente i valori del C_p risentono della sommatoria della fluorescenza dei due

amplificati (fig. 14). In aggiunta l'inserimento di nuove coppie di primer incrementa la possibilità che si formino omo- e etero-dimeri a seguito dell'interazione fra i diversi oligonucleotidi inclusi nella mix di reazione. Dall'analisi della curva di *melting* risulta tuttavia possibile discriminare la specificità dell'amplificato e, nel presente caso, distinguere fra IC e DNA virale. In aggiunta calcolando il rapporto fra l'integrale dell'area del picco di *melting* corrispondente all'amplificato di interesse e l'area sottesa all'intero profilo della curva è possibile ottenere un coefficiente che permette di correggere i valori della fluorescenza. In questo modo è approssimabile il solo contributo dell'amplificato di interesse (Ririe et al., 1997). I risultati ottenuti nelle diverse prove sono stati tuttavia insoddisfacenti; non è stato infatti possibile realizzare una mix che permettesse di ottemperare agli obiettivi prefissati. A concentrazioni elevate di IC e corrispondenti primer la metodica perdeva molto in sensibilità, venendo precocemente amplificato il solo controllo interno a discapito del plasmide "492". Al contrario, diminuendo la presenza dei reagenti facenti parte del controllo, l'amplificazione dello stesso risultava incostante anche in presenza di ridotte quantità plasmide "492" e quindi privo di utilità. Si è conseguentemente optato per rinunciare all'utilizzo del controllo interno nell'ambito di questa metodica al fine di beneficiare delle migliori performance diagnostiche. Deve tuttavia essere ricordato come, anche in assenza di IC, durante il procedere della reazione, si possano sviluppare dei filamenti di dsDNA aspecifici, in particolare nei campioni sperimentali. Sebbene anche in questo caso sia applicabile il correttivo sopra descritto, questo aggiustamento si fonda sullo studio della curva di *melting* e quindi dei quantitativi finali di DNA. Al contrario la quantificazione si basa sull'analisi della fluorescenza durante la fase esponenziale della reazione. Conseguentemente, data la complicazione tecnica determinata da un'ulteriore elaborazione dei dati e constatato che l'esito sarebbe egualmente un'approssimazione della reale quantificazione, si è optato per non applicare questa procedura ai campioni sperimentali, accettando i limiti intrinsecamente propri della metodica.

9.3.3. Degradazione degli standard.

Ai fini della quantificazione il software richiede l'inserimento di un punto della curva standard onde poterla riproporre nello specifico esperimento. Affinché la quantificazione sia riproducibile è necessario che la concentrazione dello standard sia quanto più simile possibile a quella fornita in sede di preparazione della curva. Tuttavia, in particolare se non congelato ed a concentrazioni non elevate il DNA va inevitabilmente incontro a fenomeni di degradazione. Sebbene sia stato dimostrato che i plasmidi presentano un'elevata resistenza anche in queste condizioni (Dhanasekaran et al., 2010) è inevitabile che questi si degradino progressivamente. Si è quindi

provveduto a generare nuove curve standard e a sostituirle alle precedenti ogni qualvolta si riscontrasse un incremento nel valore dei Cp dello standard.

9.4. ESTRAZIONE DEL DNA DAI CAMPIONI DI TESSUTO

In sede di estrazione del DNA virale non si sono presentati problemi degni di nota. L'utilizzo del Hybaid RiboLyzer e la scelta dello specifico protocollo, comprensivo di digestione overnight, sono stati adottati in quanto determinanti una migliore omogeneizzazione e lisi del campione. L'analisi dei risultati inerenti all'efficacia di estrazione del controllo interno ha permesso di riscontrare una differenza statisticamente significativa fra il quantitativo di DNA inoculato e quello effettivamente estratto (fig. 15).

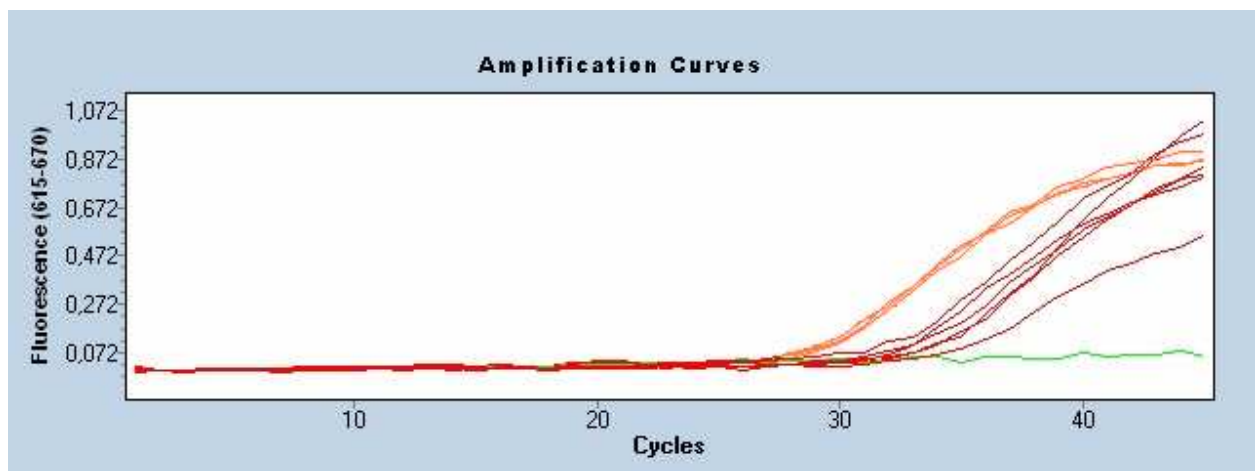


Fig. 15. Efficienza di estrazione. In arancione = 2×10^5 di IC; in rosso = copie estratte a partire da 2×10^5 copie di IC; in verde = controllo negativo.

Nello specifico si è osservato una concentrazione inferiore di oltre venti volte, evidenziando un'efficienza di estrazione piuttosto bassa (4,52%). Al contrario non si è dimostrata una differenza significativa nell'efficienza di estrazione fra le due matrici considerate e fra i diversi replicati. La costanza di questo parametro è in primo luogo prerequisito necessario per la comparazione di campioni diversi. Ai fini di una futura implementazione del test, sarebbe possibile utilizzare il plasmide IC come "full-process IC". L'aggiunta di questo durante la fase di estrazione permetterebbe infatti di individuare eventuali perdite di DNA target legate a deficit durante questo processo. I limiti manifestatisi in sede di estrazione, sicuramente degni di nota, devono tuttavia essere considerati in chiave pratica. Le metodiche confrontate, ed in particolare la PROBE, hanno rivelato nel loro complesso una sensibilità considerevole, rendendo complessivamente soddisfacenti i risultati ottenuti. È stato precedentemente riportato come diversi studi abbiano correlato i titoli virali allo stato clinico dell'animale. Tuttavia quanto appena evidenziato, in accordo con quanto riportato da Hjulsager et al. (Puvanendiran et

al.,2011), rende manifesta l'impossibilità di definire un cut off di salute/malattia universalmente valido. Allo stato attuale i termini della classificazione dipendono dai protocolli e dalla strumentazione utilizzati e conseguentemente i criteri di interpretazione devono essere definite da ciascun laboratorio. Conseguentemente qualora si desiderasse in futuro estendere le applicazioni delle diagnostiche confrontate anche alla diagnosi clinica di malattia la bassa resa di estrazione non rappresenterebbe un ostacolo.

BUFFER AE

L'analisi dei buffer AE inerenti i singoli gruppi di campioni ha rivelato alcune positività. Ciò ha ovviamente posto il problema di discriminare se queste derivassero da una contaminazione della singola aliquota o piuttosto del reagente nella sua totalità. L'analisi delle rimanenze dei kit precedentemente usati ha permesso di escludere quest'ultima eventualità. La possibilità di un interessamento della singola aliquota appare una spiegazione plausibile in funzione della prossimità spazio-temporale delle operazioni inerenti l'estrazione dei campioni sperimentali e il prelevamento della quota di buffer di eluizione. La presenza di elementi virali o quantomeno del loro materiale genetico nell'ambiente, nella strumentazione usata e sugli operatori rappresenta un'eventualità tutt'altro che remota. In tal senso è necessario evidenziare come limiti di tipo strutturale e logistico abbiano impedito di ottemperare in pieno a tutte le pratiche finalizzate a minimizzare questa tipologia di rischi. In particolare non è stato possibile utilizzare nell'ambito delle fasi di preparazione degli standard e dei controlli positivi strumentazioni dedicate. In aggiunta l'accesso del personale nelle aree adibite a questo scopo dovrebbe essere ridotto all'essenziale, provvedimento ovviamente inapplicabile in un laboratorio, modesto per dimensioni, ed adibito anche ad attività didattica. Tuttavia il riscontro di positività ad entrambe le metodiche fa propendere maggiormente per una contaminazione da parte di DNA virale piuttosto che plasmidico. Gli inserti infatti risultano specifici ciascuno per una sola delle coppie di primer. L'assenza di una correlazione temporale fra le diverse positività lascia presupporre l'efficacia delle buone pratiche di laboratorio applicate prima di procedere all'estrazione della dozzina di campioni successiva. In funzione di queste considerazioni, esclusi i campioni corrispondenti ai buffer AE risultati positivi, è stato possibile asserire la validità dei risultati inerenti gli altri lotti. L'utilizzo della seconda aliquota a disposizione ha permesso di effettuare una nuova estrazione e di evitare la perdita di dati.

9.5. VALIDAZIONE

Durante l'esecuzione delle prove necessarie alla definizione delle caratteristiche analitiche della metodica si sono presentate diverse difficoltà nell'ottenimento di soggetti negativi. Tutti i

soggetti testati, inizialmente selezionati sulla base dell'età al fine di minimizzare la probabilità che fossero infetti, si sono rivelati positivi. Si è quindi optato per l'individuazione di soggetti sieronegativi sia alle IgM che alle IgG e quindi teoricamente mai venuti a contatto con il patogeno nel breve (IgM) e nel lungo periodo (IgG). I risultati positivi ottenuti tramite la metodica PROBE nei due soggetti considerati hanno ovviamente richiesto un approfondimento delle indagini. Si è infatti sospettata una possibile carenza di specificità, conseguente al riconoscimento da parte dei primer e della sonda di sequenze proprie di PCV1. In primo luogo si è proceduto all'esame della sequenza compresa fra i primer P1570F/P1642R e 83F/83R. A tal fine le corrispondenti regioni del genoma di PCV2 sono state allineate tramite Clustal w2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) a tutte le sequenze di PCV1 ottenute tramite ricerca in Pubmed. Scarsamente significative si sono rivelate le percentuali di identità fra le sequenze dei primer 83F e 83R utilizzati nella metodica SYBR ed il genoma di PCV1. Inoltre l'elevato numero di polimorfismi presenti nella sequenza compresa fra questi permetterebbe di differenziare un eventuale amplificato aspecifico tramite l'analisi della curva di *melting*.

Le similarità delle sequenze per quanto concerne i reagenti utilizzati nella metodica PROBE si sono rivelate maggiori (tab. 26). In aggiunta è necessario considerare come le identità di sequenza interessino tratti particolarmente delicati ai fini della specificità della metodica quali le estremità 3' dei primer e l'estremità 5' della sonda. Per comprendere la reale origine della positività due campioni di linfonodo, appartenenti a soggetti diversi, sono stati sottoposti a PCR utilizzando le coppie di primer 492F/492R e 83F/83R, sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio (per valutare la presenza o meno di amplificato delle dimensioni specifiche) e quindi sequenziati. I cromatogrammi ottenuti sono stati analizzati con il software Finch TV (www.geospiza.com/finchtv/) mentre le sequenze consenso, da sottoporre ad analisi BLAST, sono state ottenute con Chromas Pro 1.5 (Technelysium Pty Ltd). Il software ha rivelato una percentuale di identità delle nostre sequenze rispetto alle corrispondenti sequenze di PCV2 pari rispettivamente al 99 e 100% e del 84% e 85% rispetto alle corrispondenti sequenze di PCV1. Questo risultato ha evidenziato una reale positività per PCV2, in conflitto con i risultati della sierologia. Le possibili spiegazioni sono varie. Un'ipotesi è che si tratti di un'infezione recente, per la quale non sia trascorso tempo sufficiente allo sviluppo di una rilevabile risposta immunitaria. Sfortunatamente i soggetti in questione sono stati sacrificati, rendendo impossibile il monitoraggio della sieroconversione. È tuttavia egualmente possibile trarre alcune conclusioni a riguardo. Trattandosi di animali adulti ed allevati in presenza di altri soggetti rivelatisi sieropositivi è improbabile che questi siano venuti a contatto con l'infezione solo poco prima della macellazione. Inoltre successive analisi hanno evidenziato la positività dei soggetti in

diversi tessuti (polmone, linfonodo inguinale e siero). L'evidenza di viremia e di un'ampia diffusione in tessuti diversi fa presumere che l'infezione sia iniziata diversi giorni prima, rendendo improbabile questa ipotesi. Sebbene sia descritto uno stato di immunodepressione associato ad una diminuzione dei titoli anticorpali nei soggetti infetti, questo riguarda individui affetti da PCVD e quindi tipicamente soggetti giovani. In ogni caso l'autore non è a conoscenza di articoli in cui siano riportati animali, sopravvissuti fino all'età adulta, incapaci di montare in senso assoluto una risposta immunitaria dopo l'infezione con virus non inattivati. La graduale diminuzione dei titoli anticorpali è altresì fortemente improbabile in funzione della significativa durata dell'immunità e del perpetuarsi dello stimolo antigenico in individui infetti. Conseguentemente, sebbene non possano essere esclusi i possibili limiti della metodica sierologica e quindi l'eventualità di essersi confrontati con dei falsi negativi, l'interrogativo apertosi in tale frangente meriterebbe sicuramente un futuro approfondimento date le notevoli implicazioni in termini patogenetici, epidemiologici e diagnostici.

| | | |
|------------------------------------|--|-------------------------------|
| 5'- PRIMER P1570F | PROBE P1591 | PRIMER P1640R -3' |
| TGGCCCGCAGTATTCTGATT **** ***** | ACCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTC ***** ** ***** | CTCAACTGCTGTCCCAGCTG ***** |

Tab. 26. * siti di omologia fra la sequenza di PCV2 compresa fra i primer P1570F e P1640R e la corrispondente regione di PCV1.

9.6. SPECIFICITÀ :PCV1 vs PCV2

A prescindere dalle evidenze sopra riportate, l'analisi *in silico* dell'elevata percentuale di identità di sequenza fra i Circovirus suini nella regione compresa fra i primer 1579F e 1642R ha reso necessario un approfondimento di questa problematica. Confermata la presenza di PCV1 nella linea cellulare utilizzata nonché la specificità dei primer PCV1F e PCV1R tramite corsa elettroforetica degli amplificati, si è proceduto all'analisi dell'estratto di PK-15 seguendo la metodica PROBE. Sebbene l'analisi della fluorescenza abbia evidenziato un incremento della stessa nei campioni corrispondenti alle diverse diluizioni di PK-15 questa presentava un andamento anomalo (fig. 16). L'assenza di un netto punto di flesso rende impossibile allo strumento il calcolo della derivata seconda e conseguentemente tutti questi campioni sono stati classificati come negativi o, al massimo, dubbi. Conseguentemente la presenza di PCV1 nei campioni sperimentali non dovrebbe essere all'origine di false positività. In aggiunta, in presenza di coinfezione da parte dei due *Circovirus*, la maggiore affinità di legame dei primer specifici dovrebbe dare origine al fenomeno della "PCR-selection" in funzione del quale, in presenza di DNA target diversi, il rapporto fra gli *output* di reazione risulta maggiore del rapporto fra gli *input*, risultando in un over-amplificazione del template verso il quale i primer manifestano maggior specificità (Polz et al., 1998). Infine non deve essere dimenticata la scarsa prevalenza

dell'infezione da PCV1 nella popolazione suina. Sebbene la letteratura non sia cospicua, studi eseguiti negli USA hanno riportato una sieroprevalenza del 21,6% ed una prevalenza dell'infezione del 2,4% (Puvanendiran et al., 2011).

Tuttavia non potendosi escludere aprioristicamente una lieve sovrastima dei titoli virali di PCV2 determinata dalla presenza di PCV1 si è provato ad eliminare il rilevamento di quest'ultimo sfruttando un incremento delle temperatura di annealing/extension.

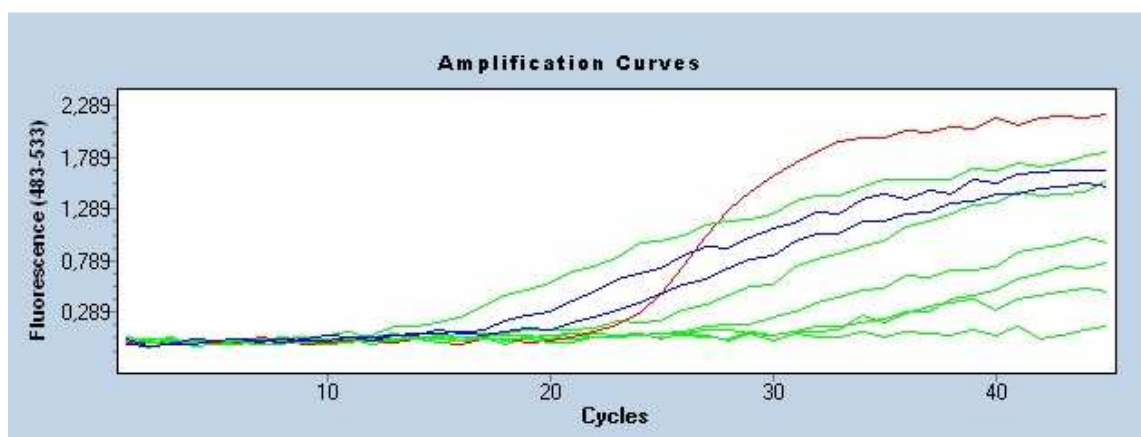


Fig. 16. Diluizioni in base 10 del DNA estratto da PK-15. Annealing/extension a 60°C. In rosso = positivi (controllo positivo); in blu = dubbi, in verde = negativi

La stabilità del legame fra due filamenti di DNA è funzione della numerosità e della forza dei legami insorgenti fra le basi. Conseguentemente un incremento della temperatura, in presenza di diversi mismatches, determinerà una maggiore denaturazione della doppia elica di DNA o, nel nostro caso, un minor appaiamento dei singoli filamenti.

Innalzando la temperatura fino a 65°C è stato possibile ottenere l'amplificazione dei soli campioni di PCV2 senza che si osservasse alcun incremento della fluorescenza al di sopra del background per quanto concerne i campioni positivi a PCV1 (fig. 17). L'analisi della curva

standard ha evidenziato performance comparabili a quelle riscontrate alle precedenti condizioni (tab. 27). Confrontando i campioni sperimentali esaminati con entrambi i protocolli il T-student's test a due campioni accoppiati non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa. Identici risultati sono stati raggiunti dalla comparazione sia dei Cp che dei titoli virali,

| PERFORMANCE | |
|--------------|---|
| LOD | $4,72 \times 10^1$ Cp=33,49±0,02 |
| RANGE | $4,72 \times 10^8$ - $4,72 \times 10^1$ (r=-0,999 r ² =0,999) |
| E(%) | 89,6 |
| Errore | 0,02 |
| Cp IC | 32,57±1,27 |
| Conc. Target | $4,72 \times 10^1$ |

Tab. 27. Performance della curva standard ottenute con temperatura di annealing/extension di 65°C

ottenuti con entrambi i protocolli, delle reazioni in cui era stata prevista la presenza, a differenti diluizioni, di ambedue i virus rispetto ai risultati riscontrati in presenza del solo PCV2 (fig. 18; fig. 19). Non si è infatti evidenziata una differenza statisticamente significativa nè in funzione

del protocollo termico usato nè della presenza o meno del DNA di PCV1. L'insieme di queste considerazioni ha permesso di asserire la validità dei dati precedentemente ottenuti.

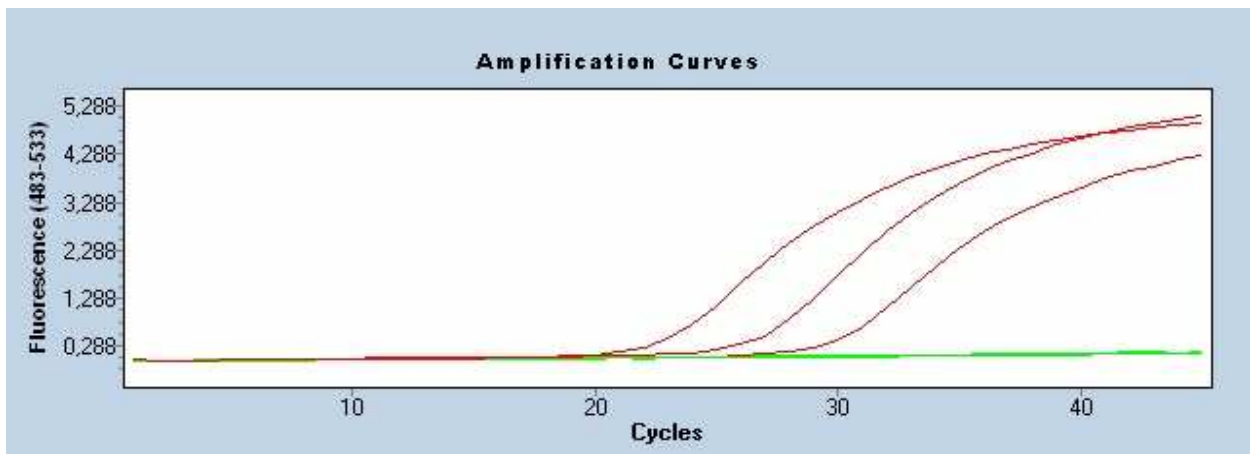


Fig. 17. Diluizioni in base 10 del DNA estratto da PK-15. Annealing/extension a 65°C. In rosso = positivi (controllo positivo); in blu= dubbi; in verde = negativi. Risultano positive le sole diluizioni del plasmide P1-1C

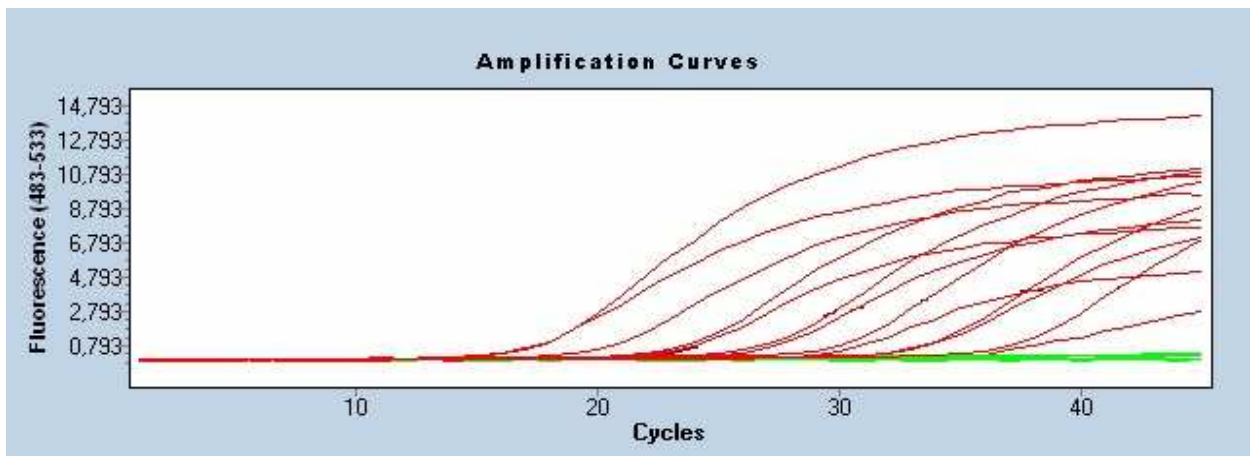


Fig. 18. Diluizioni dell'estratto 4699D4-1 in assenza ed in presenza di un quantitativo costante di estratto di PK-15. Annealing/extension a 65°C. In rosso = positivi; in blu = dubbi; in verde = negativi

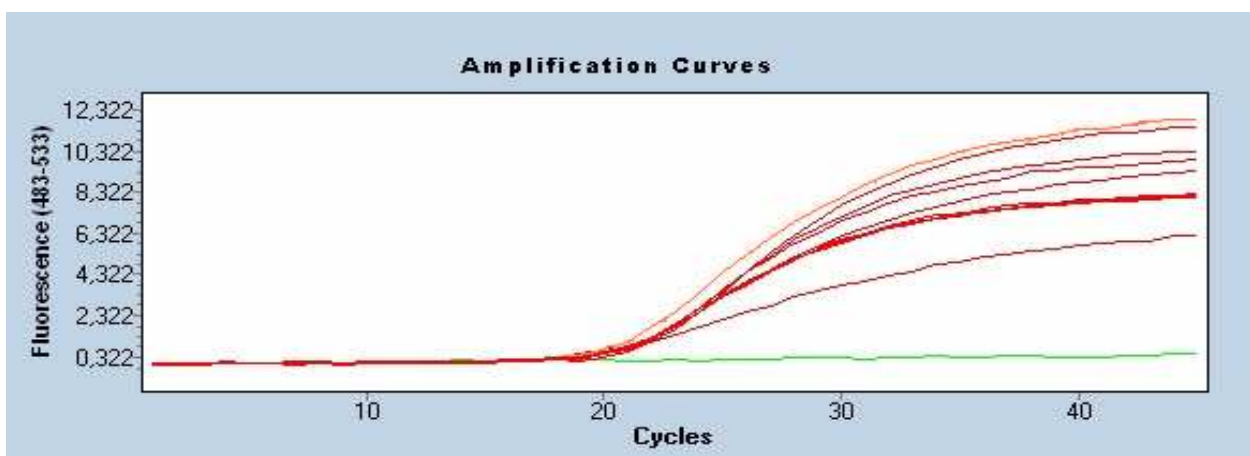


Fig. 19. Diluizioni dell'estratto di PK-15 in presenza di un quantitativo costante di estratto di 4699D4-1. Annealing/extension a 65°C. In arancione è riportato la fluorescenza corrispondente al solo 4699D4-1. In rosso = positivi; in blu = dubbi; in verde = negativi.

9.7. *rt-PCR SUI CAMPIONI SPERIMENTALI E ANALISI STATISTICA*

9.7.1. Metodiche

In considerazione del ruolo di Gold standard tipicamente attribuito all'immunoistochimica si è proceduto col valutare in primo luogo il grado di accordo sussistente fra questa ed i risultati ottenuti tramite le due metodiche di *rt-PCR* (tab. 28).

| | IHC | | |
|--------------|--------------|-------|-------|
| | K | Sp | Se |
| PROBE | 0,124±0,018* | 98,6% | 30,8% |
| SYBR | 0,636±0,046* | 82,4% | 89,7% |

Tab. 28. * = $p < 0,05$
Confronto fra metodiche assumendo come Gold standard l'IHC

Da una prima analisi è risultato evidente il maggior accordo della metodica SYBR rispetto alla PROBE, caratterizzata da maggior sensibilità ma fortemente carente in termini di specificità. Tale affermazione si fonda tuttavia sul presupposto di attribuire all'IHC una sensibilità del 100%, ossia un'assoluta capacità di individuare come positivi soggetti infetti. Le reali performance diagnostiche della suddetta metodica ben si discostano dal quadro appena delineato. Sebbene sia universalmente riconosciuta come un valido strumento nella diagnosi di malattia, presenta evidenti limiti nella diagnosi del solo stato di infezione. È stato infatti dimostrato come si rendano necessari titoli virali pari a 10^8 copie di genoma di PCV2 per 500ng di DNA affinché sia dimostrabile una positività all'IHC (Brunburg et al., 2004). Il confronto fra i campioni positivi e negativi all'IHC ha evidenziato titoli significativamente più alti ($p < 0,05$) nei primi rispetto ai secondi (fig. 20; fig. 21) (tab. 29).

In aggiunta è interessante notare che i più bassi titoli virali quantificati tramite le metodiche PROBE e SYBR attribuibili a campioni positivi all'IHC sono stati rispettivamente 133 e 2876 copie/mg (tab. 36).

| PARAMETRO | PROBE | | SYBR | |
|----------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| | IHC - | IHC + | IHC - | IHC + |
| Media | $1,20 \times 10^7$ | $9,46 \times 10^8$ | $1,27 \times 10^7$ | $3,97 \times 10^8$ |
| Mediana | 19,63 | $8,93 \times 10^7$ | 0 | $1,38 \times 10^6$ |
| Dev.Standard | $1,40 \times 10^8$ | $3,21 \times 10^9$ | $1,96 \times 10^8$ | $1,72 \times 10^9$ |
| Minimo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Massimo | $2,22 \times 10^9$ | $2,56 \times 10^{10}$ | $3,68 \times 10^9$ | $1,40 \times 10^{10}$ |
| Range interquartile | 381,2 | $5,20 \times 10^8$ | 0 | $6,28 \times 10^7$ |

Tabella 29 Statistiche descrittive delle due metodiche classificate in base ai risultati dell'IHC

Questo riscontro suggerisce come gli scarsi accordi fra le metodiche considerate siano con tutta probabilità da ricondursi ad una mancanza di sensibilità del Gold standard. Si sono quindi confrontate fra loro rinunciando all'assunto iniziale (tab. 30).

| | K | | | Se | | | Sp | | |
|-------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR |
| IHC | | 0,124±0,018* | 0,636±0,046* | | 22,2% | 61,6% | | 99,1% | 96,2% |
| PROBE | 0,124±0,18* | | 0,175±0,022* | 98,6% | | 99% | 30,8% | | 33% |
| SYBR | 0,636±0,046* | 0,175±0,022* | | 82,4% | 29,8% | | 89,7% | 99,1% | |

Tab. 30. * = $p < 0,05$

Confronto fra metodiche; in colonna è riportata la metodica assunta come riferimento.

Assumendo come metodiche di riferimento le analisi di biologia molecolare si è potuto evidenziare quanto precedentemente supposto; l'IHC presenta infatti dei rilevanti limiti di sensibilità nel confronto con ambedue le metodiche, sebbene più spiccati nel caso della PROBE. Come facilmente desumibile dal buon accordo sussistente fra IHC e SYBR, il confronto fra le metodiche di rt-PCR ripropone lo scenario precedentemente descritto: uno scarso accordo caratterizzato, a seconda del riferimento scelto, da scarsa sensibilità del SYBR o scarsa specificità della PROBE.

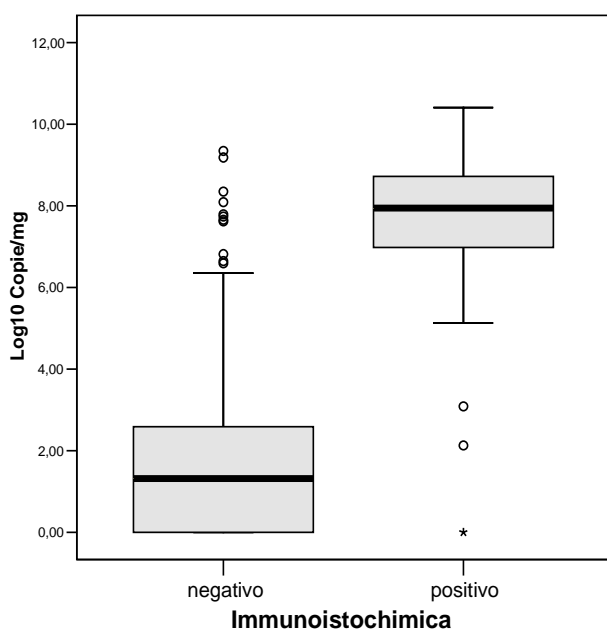


Fig. 20. Boxplot di confronto fra i titoli virali riscontrati tramite PROBE in campioni positivi e negativi all'IHC

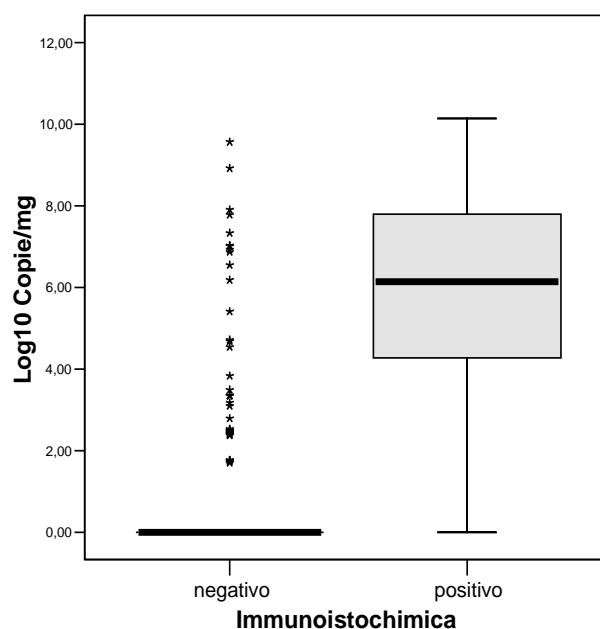


Fig. 21. Boxplot di confronto fra i titoli virali riscontrati tramite SYBR in campioni positivi e negativi all'IHC

9.7.2. Matrici

Le caratteristiche del materiale biologico da cui è stato estratto il DNA possono interferire in vario modo nella reazione di PCR e conseguentemente nei risultati della diagnostica. In considerazione del fatto che la presenza di *bias* riconducibili all'effetto di singole matrici può ovviamente condizionare le conclusioni ottenute dalla totalità dei campioni, si è optato per una disamina più approfondita di quest'ultime. Uno studio preliminare ha indagato l'accordo delle diverse metodiche nell'ambito di specifici tessuti. Il riscontro di una piena concordanza, anche se limitata a singoli organi, avrebbe infatti reso vani ulteriori confronti, rimandando a ragioni di ordine pratico ed economico la scelta della diagnostica utilizzata. Dalla tab. 31 (A,B,C,D,E) è possibile constatare come la tendenza evidenziata dalla globalità dei campioni si ripresenti nelle singole matrici. Un accordo eccellente è riscontrabile fra le metodiche SYBR e IHC nel solo linfonodo inguinale, mentre sostanziale risulta l'accordo in ileo e linfonodo mediastinico. Al contrario la PROBE presenta un accordo lieve o al massimo discreto con entrambe le metodiche in tutti i tessuti considerati. Ciò permette di ritenere secondaria l'influenza della matrice nel determinismo delle differenti performance. Ciononostante il riscontro di diverse sensibilità e specificità diagnostiche evidenti al variare dell'organo pone egualmente l'accento sulle diverse potenzialità dei vari tessuti. Si è quindi optato per valutare i risultati di ogni singola metodica nei cinque organi a disposizione (tab. 32; tab. 33; tab. 34).

| LINF. I. | K | | | Se | | | Sp | | |
|----------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR |
| IHC | | 0,175±0,046* | 0,857±0,07* | | 25,8% | 88,2% | | 100% | 97,4% |
| PROBE | 0,175±0,046* | | 0,175±0,046* | 100% | | 100% | 37,2% | | 37,2% |
| SYBR | 0,857±0,070* | 0,175±0,046* | | 88,2% | 25,8% | | 97,4% | 100% | |

A

| POLM. | K | | | Se | | | Sp | | |
|-------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR |
| IHC | | 0,056±0,020 | 0,378±0,095* | | 13,3% | 32,3% | | 100% | 98,6% |
| PROBE | 0,056±0,020 | | 0,188±0,046* | 100% | | 100% | 21,7% | | 27,8% |
| SYBR | 0,378±0,095* | 0,188±0,046* | | 90,9% | 37,3% | | 77,2% | 100% | |

B

| ILEO | K | | | Se | | | Sp | | |
|-------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR |
| IHC | | 0,097±0,039* | 0,730±0,090* | | 22,1% | 77,8% | | 95,8% | 95,2% |
| PROBE | 0,097±0,039* | | 0,097±0,039* | 94,4% | | 94,4% | 27,7% | | 27,7% |
| SYBR | 0,730±0,090* | 0,097±0,039* | | 77,8% | 22,1% | | 95,2% | 95,8% | |

C

| LINF.M. | K | | | Se | | | Sp | | |
|---------|--------------|-------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR |
| IHC | | 0,145±0,057 | 0,745±0,107* | | 34,1% | 84,6% | | 100% | 91,7% |
| PROBE | 0,145±0,057 | | 0,132±0,053 | 100% | | 100% | 22,9% | | 22,2% |
| SYBR | 0,745±0,107* | 0,132±0,053 | | 78,6% | 31,7% | | 94,3% | 100% | |

D

| TONS. | K | | | Se | | | Sp | | |
|-------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR | IHC | PROBE | SYBR |
| IHC | | 0,171±0,047* | 0,574±0,109* | | 22,6% | 55% | | 100% | 96,1% |
| PROBE | 0,171±0,047* | | 0,252±0,057* | 100% | | 100% | 41,5% | | 44,7% |
| SYBR | 0,574±0,109* | 0,252±0,057* | | 78,6% | 32,3% | | 89% | 100% | |

E

Tab 31. * = p<0,05

(A,B,C,D,E) Confronto fra diverse metodiche in funzione della matrice testata. In colonna è riportata la metodica assunta come riferimento.

| IHC | | LINFONODO INGUINALE | POLMONE | ILEO | LINFONODO MEDIASTINICO | TONSILLA |
|------------------------|----|---------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|
| LINFONODO INGUINALE | K | | 0,584±0,116* | 0,824±0,076* | 0,845±0,086* | 0,876±0,070* |
| | Se | | 81,8% | 83,3% | 85,7% | 92,9% |
| | Sp | | 90,5% | 97,4% | 97,1% | 97,3% |
| POLMONE | K | 0,584±0,116* | | 0,560±0,116* | 0,656±0,124* | 0,459±0,136* |
| | Se | 52,9% | | 50% | 57,1% | 42,9% |
| | Sp | 97,4% | | 97,5% | 100% | 96,3% |
| ILEO | K | 0,824±0,076* | 0,560±0,116* | | 0,896±0,072* | 0,683±0,104* |
| | Se | 88,2% | 81,8% | | 85,7% | 78,6% |
| | Sp | 96,1% | 89,8% | | 100% | 93,8% |
| LINFONODO MEDIASTINICO | K | 0,845±0,086* | 0,656±0,124* | 0,896±0,072* | | 0,775±0,106* |
| | Se | 92,3% | 100% | 100% | | 90,9% |
| | Sp | 94,3% | 85,4% | 94,6% | | 91,4% |
| TONSILLA | K | 0,876±0,070* | 0,458±0,136* | 0,683±0,104* | 0,775±0,106* | |
| | Se | 86,7% | 66,7% | 68,8% | 76,9% | |
| | Sp | 98,6% | 90,7% | 96,2% | 97% | |

Tab. 32. * = p<0,05 Confronto fra le diverse matrici testate tramite IHC. In colonna è riportata la matrice assunta come riferimento.

| PROBE | | LINFONODO INGUINALE | POLMONE | ILEO | LINFONODO MEDIASTINICO | TONSILLA |
|------------------------|----|---------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|
| LINFONODO INGUINALE | K | | 0,306±0,105* | 0,312±0,106* | 0,5±0,136* | 0,201±0,108 |
| | Se | | 76,6% | 77,5% | 80% | 76,3% |
| | Sp | | 61,1% | 56,5% | 87,5% | 43,3% |
| POLMONE | K | 0,306±0,105* | | 0,378±0,110* | 0,292±0,179* | -0,04±0,092 |
| | Se | 89,4% | | 89,3% | 90,2% | 82% |
| | Sp | 37,9% | | 45,8% | 37,5% | 17,6% |
| ILEO | K | 0,312±0,106* | 0,378±0,110* | | 0,321±0,167* | 0,297±0,102* |
| | Se | 84,6% | 83,8% | | 85,4% | 85,2% |
| | Sp | 44,8% | 57,9% | | 50% | 42,4% |
| LINFONODO MEDIASTINICO | K | 0,500±0,136* | 0,292±0,179* | 0,321±0,167* | | 0,189±0,133* |
| | Se | 97% | 88,1% | 89,7% | | 89,3% |
| | Sp | 46,7% | 42,9% | 40% | | 27,8% |
| TONSILLA | K | 0,201±0,108 | -0,04±0,092 | 0,297±0,102* | 0,189±0,133 | |
| | Se | 72,6% | 64,1% | 73,2% | 65,8% | |
| | Sp | 48,1% | 35,3% | 60,9% | 62,5% | |

Tab. 33. * = p<0,05 Confronto fra le diverse matrici testate tramite PROBE. In colonna è riportata la matrice assunta come riferimento.

| SYBR | | LINFONODO INGUINALE | POLMONE | ILEO | LINFONODO MEDIASTINICO | TONSILLA |
|------------------------|----|---------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|
| LINFONODO INGUINALE | K | | 0,571±0,095* | 0,754±0,088* | 0,742±0,108* | 0,565±0,111* |
| | Se | | 53,6% | 77,8% | 84,6% | 57,9% |
| | Sp | | 97% | 96,1% | 91,4% | 94,3% |
| POLMONE | K | 0,571±0,095* | | 0,589±0,092* | 0,619±0,120* | 0,484±0,100* |
| | Se | 88,2% | | 88,9% | 84,6% | 75% |
| | Sp | 83,3% | | 84% | 83,3% | 81,3% |
| ILEO | K | 0,754±0,088* | 0,589±0,092* | | 0,701±0,113* | 0,520±0,111* |
| | Se | 82,4% | 55,2% | | 84,6% | 68,8% |
| | Sp | 94,8% | 97,1% | | 88,9% | 88,5% |
| LINFONODO MEDIASTINICO | K | 0,742±0,108* | 0,619±0,120* | 0,701±0,113* | | 0,835±0,092* |
| | Se | 78,6% | 64,7% | 73,3% | | 91,7% |
| | Sp | 94,1% | 93,8% | 94,1% | | 94,1% |
| TONSILLA | K | 0,565±0,111* | 0,484±0,100* | 0,520±0,111* | 0,835±0,092* | |
| | Se | 73,3% | 51,7% | 68,8% | 84,6% | |
| | Sp | 89,2% | 92,4% | 88,5% | 97% | |

Tab. 34. *= p<0,05 Confronto fra le diverse matrici testate tramite SYBR. In colonna è riportata la matrice assunta come riferimento.

La prima conclusione che è stato possibile trarre per quanto concerne l'accordo fra i diversi tessuti è che questo risultava complessivamente da lieve a moderato nel caso della PROBE e da moderato a perfetto nel caso del SYBR. In assenza di un organo assumibile univocamente come riferimento, è stata calcolata, per ciascun tessuto, la media di sensibilità e specificità derivante dai confronti con gli altri organi (tab. 35). Si è quindi osservato che, per la metodica PROBE, i valori di sensibilità e specificità più elevati sono ottenibili rispettivamente dal linfonodo mediastinico e inguinale; alla tonsilla e al polmone sono invece attribuibili le peggiori performance in termini di sensibilità e specificità.

| | | LINFONODO INGUINALE | POLMONE | ILEO | LINFONODO MEDIASTINICO | TONSILLA |
|-------|------------|---------------------|--------------|-------------|------------------------|--------------|
| IHC | Se (Media) | 85,92±4,26% | 50,72±5,18% | 83,57±3,67% | 95,80±4,23% | 74,77±7,87% |
| | Sp (Media) | 95,57±2,93% | 97,8±1,35% | 94,92±3,70% | 91,42±3,70% | 95,62±2,97 |
| PROBE | Se (Media) | 77,60±1,45% | 87,73±3,32% | 84,75±0,62% | 91,03±3,50% | 68,93±4,03% |
| | Sp (Media) | 62,10±16,05% | 34,70±10,41% | 48,78±5,94% | 39,35±7,08% | 51,70±10,99% |
| SYBR | Se (Media) | 68,47±13,04% | 84,17±5,54% | 72,75±11,8% | 77,07±9,79% | 69,60±11,83% |
| | Sp (Media) | 94,70±2,14% | 82,97±1,01% | 92,32±3,72% | 94,02±0,13% | 68,67±12,08% |

Tab. 35. Media dei valori di sensibilità e specificità ottenuta, per ogni metodica, dal confronto di ciascuna matrice con i risultati degli altri organi, assunti come riferimento.

Dall'analisi dei titoli virali si sono potuti evidenziare interessanti elementi. In primo luogo per tutti i tessuti era riscontrabile un'evidente differenza in termini di media e mediana fra i campioni positivi o negativi all'IHC. Questo permette di supportare ulteriormente la maggiore sensibilità diagnostica della rt-PCR approntata. In modo congruo il range compreso fra il 25th e il 75th percentile risulta di gran lunga inferiore nei campioni negativi (fig. 22; fig. 23; tab. 36). Ciò evidenzia un disaccordo fra le due metodiche concentrato in particolare nel limite inferiore della titolazione virale e quindi suggestivo di una carenza della metodica usualmente considerata come standard nel rilevare limitate quantità di PCV2. Solo raramente si sono riscontrati titoli elevati in assenza di positività all'IHC. Sebbene non sia escludibile come causa una mancanza di specificità riconducibile alle caratteristiche della reazione o ad errori in fase di processazione ed analisi del campione, è altresì necessario ricordare come altri studi (Brunborg et al., 2004; Krakowka et al., 2005) abbiano riscontrato risultati analoghi: alti livelli di positività tramite PCR od isolamento virale accompagnate da assente o scarsa positività all'IHC. Non essendo stato possibile definire con certezza il reale stato dei soggetti è solamente possibile accampare delle ipotesi. Il riscontro di titoli elevati rende meno probabile l'evenienza di una falsa positività legata

a cross-reattività con altri patogeni e conseguentemente, fatte salve le obiezioni precedenti, risulta più facilmente adducibile un limite della metodica di confronto. In tal senso l'analisi istologica, basandosi su sottili sezioni di tessuto, risulta meno rappresentativa dello stato dell'organo nel suo complesso.

Procedendo con la disamina, nei diversi tessuti risultati positivi all'IHC, si è potuta evidenziare una differenza, sebbene statisticamente non significativa ($p = 0,132$), fra le mediane associate alle diverse matrici (fig. 22; tab. 36). In particolare il linfonodo mediastinico è risultato presentare titoli più elevati oltre ad una maggiore variabilità negli stessi. L'evidenza di una maggiore carica virale, compatibile con la patogenesi dell'infezione, permetterebbe di giustificare la maggiore sensibilità diagnostica ad esso associata (tab. 35). Parallelamente l'analisi dei titoli in tessuti negativi all'immunoistochimica (fig. 23) ha evidenziato titoli significativamente più elevati a livello del linfonodo mediastinico e del polmone. In particolare per quest'ultimo, fra le possibili spiegazioni è nuovamente adducibile una mancanza di sensibilità dell'IHC. Infatti, dal confronto fra i diversi organi esaminati con questa metodica il tessuto polmonare presenta la minor sensibilità media, giustificando quindi la necessità di titoli virali maggior ai fini di una corretta classificazione. Per quanto concerne il linfonodo mediastinico, considerando i risultati sopraccitati, il tropismo del virus e la probabile via di infezione, è plausibile che in questa tipologia di tessuto si riscontri una più elevata prevalenza ed intensità di infezione.

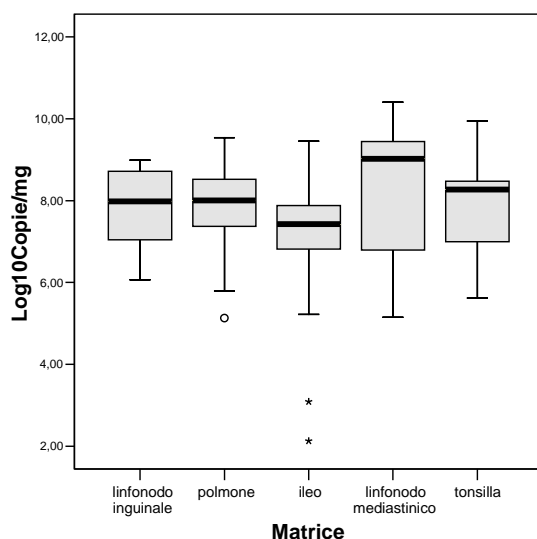


Fig. 22. Boxplot di confronto dei titoli virali rivelati tramite PROBE nelle diverse matrici in campioni riconosciuti positivi in PROBE e all'IHC.

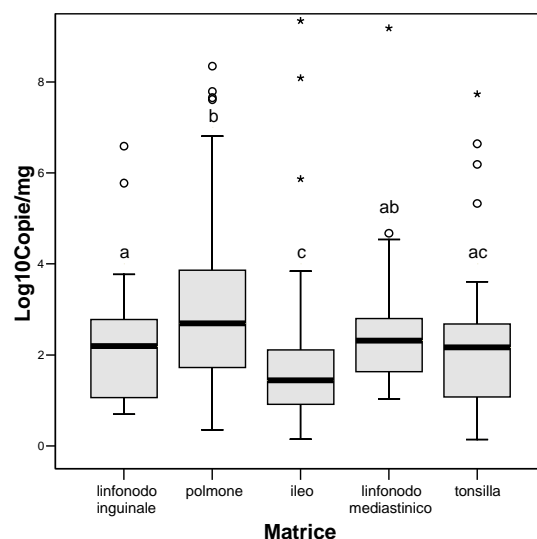


Fig. 23. Boxplot di confronto dei titoli virali rivelati tramite PROBE nelle diverse matrici in campioni riconosciuti positivi in PROBE e negativi all'IHC.

Esaminando la metodica SYBR, maggiore sensibilità è stata ottenuta nel polmone mentre la specificità media è risultata massima a livello del linfonodo inguinale. Il tessuto tonsillare è

risultato invece carente (ca.70%) per entrambi i parametri, caratteristica riscontrabile in tutte le metodiche considerate, con la sola eccezione della specificità nell'ambito dell'IHC (tab. 35). Paradossalmente dal confronto fra i tessuti, a livello tonsillare, si sono osservati titoli elevati sia in SYBR che in PROBE (fig. 22; fig. 24). Risulta difficile addurre spiegazioni convincenti a giustificazione di questo riscontro. È tuttavia lecito ipotizzare che a fondamento vi siano le caratteristiche biologiche dell'interazione virus-ospite. Le tonsille rappresentano la prima sede di ingresso e replicazione del virus, conseguentemente non è improbabile identificare a questo livello titoli elevati. L'entità della disseminazione e replicazione a livello sistemico possono viceversa risultare estremamente variabili, in funzione della presenza dei diversi co-fattori precedentemente descritti. Appare quindi plausibile la presenza di infezione in questo distretto senza che questa sia riscontrabile in altri organi in quanto non ancora o troppo debolmente interessati da PCV2.

L'elevato accordo fra IHC e SYBR ed il conseguente esiguo numero di campioni negativi al primo e positivi al secondo rende difficile riprodurre in questo contesto il confronto dei titoli virali eseguita nel caso della PROBE. In tali condizioni infatti i valori estremi presentano un peso relativo di gran lunga superiore, deviando verso titoli più elevati le statistiche descrittive.

Ciononostante è comunque possibile identificare un trend analogo al precedente metodo, caratterizzato da medie e mediane più basse ed un range interquartile minore nei campioni negativi all'IHC (tab. 36). Il confronto dei titoli virali non ha evidenziato differenze statisticamente significativa fra le diverse matrici, indipendentemente dalla positività o negatività all'IHC (fig. 24; fig. 25). Di interesse è altresì il paragone fra i risultati delle due metodiche dopo

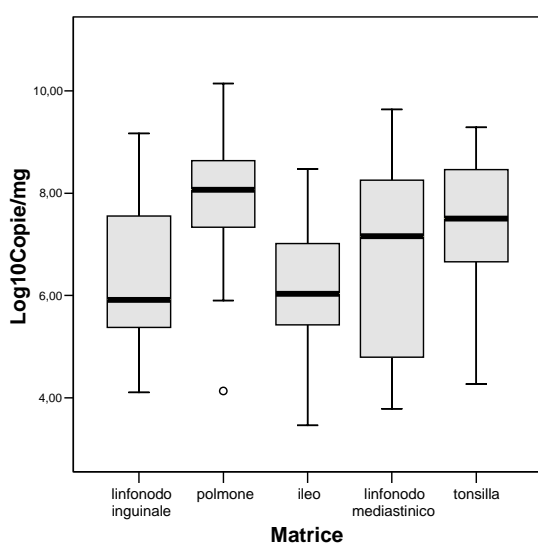


Fig. 24. Boxplot di confronto dei titoli virali rivelati tramite SYBR nelle diverse matrici in campioni riconosciuti positivi in SYBR e all'IHC.

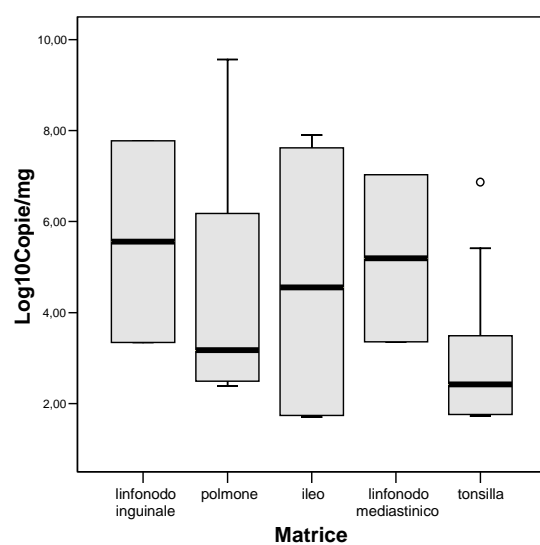


Fig. 25. Boxplot di confronto dei titoli virali rivelati tramite SYBR nelle diverse matrici in campioni riconosciuti positivi in SYBR e negativi all'IHC.

classificazione sulla base dell'IHC (tab. 36). Nei diversi organi la metodica basata sull'uso di oligonucleotidi marcati è stata in grado di rilevare titoli virali di 2-3 gradi logaritmici inferiori rispetto a quelli definibili con il SYBR GREEN I. In modo analogo nei campioni positivi i valori della mediana si sono rivelati invariabilmente più elevati nel primo caso rispetto al secondo, con la sola eccezione del polmone nei quali i valori risultavano dello stesso ordine di grandezza.

| TESSUTO | PARAMETRO | TITOLI PROBE | | TITOLI SYBR | |
|---------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | IHC - | IHC + | IHC - | IHC + |
| LINFONODO INGUINALE | Media | 9,21X10 ⁵ | 2,58X10 ⁸ | 3,01X10 ⁷ | 1,21 X10 ⁸ |
| | Mediana | 155,08 | 9,63X10 ⁷ | 3,01X10 ⁷ | 8,21X10 ⁵ |
| | Dev.Standard | 5,60X10 ⁵ | 3,02X10 ⁸ | 4,26X10 ⁷ | 3,77X10 ⁸ |
| | Minimo | 3,90 | 1,16 X10 ⁶ | 2205 | 1,27X10 ⁴ |
| | Massimo | 3,89X10 ⁶ | 9,88X10 ⁸ | 6,03X10 ⁷ | 1,48X10 ⁹ |
| | Range interquartile | 599,50 | 5,21X10 ⁸ | - | 4,87X10 ⁷ |
| POLMONE | Media | 5,35X10 ⁶ | 4,79X10 ⁸ | 2,16X10 ⁸ | 1,64X10 ⁹ |
| | Mediana | 491,58 | 1,01X10 ⁸ | 1487,57 | 1,21X10 ⁸ |
| | Dev.Standard | 2,80X10 ⁷ | 1X10 ⁹ | 8,16X10 ⁸ | 4,36X10 ⁹ |
| | Minimo | 1,3 | 1,35X10 ⁵ | 242,2 | 1,35X10 ⁴ |
| | Massimo | 2,24X10 ⁸ | 3,44X10 ⁹ | 3,69X10 ⁹ | 1,40X10 ¹⁰ |
| | Range interquartile | 7729,5 | 3,14X10 ⁸ | 2,53X10 ⁶ | 6,49X10 ⁸ |
| ILEO | Media | 3,92X10 ⁷ | 2,10X10 ⁸ | 2,55X10 ⁷ | 2,80X10 ⁷ |
| | Mediana | 26,72 | 2,66X10 ⁷ | 1,08X10 ⁷ | 1,11X10 ⁶ |
| | Dev.Standard | 2,88X10 ⁸ | 6,79X10 ⁸ | 3,80X10 ⁷ | 7,95X10 ⁷ |
| | Minimo | 0,4 | 133 | 49,2 | 2876,2 |
| | Massimo | 2,23X10 ⁹ | 2,84X10 ⁹ | 8,04X10 ⁷ | 2,99X10 ⁸ |
| | Range interquartile | 122,2 | 9,04X10 ⁷ | 6,57X10 ⁷ | 1,13X10 ⁷ |
| LINFONODO MEDIASTINICO | Media | 5,67 X10 ⁷ | 2,99X10 ⁹ | 5,34 X10 ⁶ | 5,25X10 ⁸ |
| | Mediana | 206,087 | 1,11X10 ⁹ | 5,34 X10 ⁶ | 1,43X10 ⁷ |
| | Dev.Standard | 2,95X10 ⁸ | 6,67X10 ⁹ | 7,55X10 ⁶ | 1,30X10 ⁹ |
| | Minimo | 9,8 | 1,42X10 ⁶ | 2261,1 | 6096,6 |
| | Massimo | 1,53X10 ⁹ | 2,57X10 ¹⁰ | 1,06 X10 ⁷ | 4,35X10 ⁹ |
| | Range interquartile | 633,8 | 2,98X10 ¹⁰ | - | 2,09X10 ⁸ |
| TONSILLA | Media | 1,26X10 ⁶ | 1,06X10 ⁹ | 8,51X10 ⁵ | 4,54X10 ⁸ |
| | Mediana | 144,95 | 1,86X10 ⁸ | 260,81 | 3,19X10 ⁷ |
| | Dev.Standard | 7,89X10 ⁶ | 2,41X10 ⁹ | 2,45X10 ⁶ | 7,51X10 ⁸ |
| | Minimo | 4 | 4,15 X10 ⁵ | 51,9 | 1,86X10 ⁵ |
| | Massimo | 5,46X10 ⁷ | 8,79X10 ⁹ | 7,40X10 ⁶ | 1,95X10 ⁹ |
| | Range interquartile | 503,1 | 5,65X10 ⁸ | 1,29X10 ⁵ | 1,33 X10 ⁹ |

Tab. 36. Confronto fra i titoli dei campioni rivelatisi positivi con le metodiche PROBE e SYBR classificati sulla base dei risultati dell'IHC

In definitiva l'insieme dei dati ottenuti ha delineato un quadro caratterizzato da un maggior accordo fra l'IHC e il SYBR rispetto alla PROBE sia nel confronto fra le metodiche che all'interno delle stesse nella comparazione dei diversi tessuti. Ad un'analisi superficiale si potrebbe rapidamente asserire la scarsa accuratezza diagnostica di quest'ultima, condizionata in particolare da scarsa specificità. Tuttavia test fondati sull'utilizzo di una sonda marcata, se correttamente disegnata, sono generalmente caratterizzati da elevati livelli della specificità. Risolti i limiti inerenti la capacità di discriminare fra PCV1 e PCV2, non sono stati individuati

altri organismi presentanti omologie di sequenza tali da far supporre un così imponente riscontro di falsi positivi.

Di particolare utilità è risultata l'analisi delle curve ROC. Definendo un numero di copie di DNA virale inferiore al quale il campione veniva considerato negativo è stato possibile migliorare significativamente le caratteristiche della PROBE, in particolare in termini di specificità (tab. 37). Ciò supporta ulteriormente quanto precedentemente affermato. La marcata diminuzione dei "falsi positivi" che si osserva per titoli virali elevati rende evidente come i limiti diagnostici siano insiti primariamente nell'IHC. Ciò non stupisce essendo questa parte del percorso diagnostico assunto come riferimento per la diagnosi di PCVD ma non nella diagnosi di infezione. Miglioramenti meno pregevoli sono ottenibili nella metodica SYBR (tab. 38), anche in considerazione del maggior accordo presente intrinsecamente.

| PROBE | CUT OFF | Se | Sp |
|------------------------|----------------------|-------|-------|
| LINFONODO INGUINALE | 8,84X10 ⁵ | 100% | 98,7% |
| POLM. | 1,13X10 ⁵ | 100% | 90,2% |
| ILEO | 132,41 | 94,4% | 83,1% |
| LINFONODO MEDIASTINICO | 9,47X10 ⁴ | 100% | 97,1% |
| TONSILLA | 3,14X10 ⁵ | 100% | 96,3% |
| TOTALE | 1,13X10 ⁶ | 95,9% | 94,9% |

Tab. 37. Performance della metodica PROBE dopo la definizione di cut-off

| SYBR | CUT OFF | Se | Sp |
|------------------------|-----------------------|-------|-------|
| LINFONODO INGUINALE | 1102,53 | 88,2% | 97,4% |
| POLMONE | 1,01X10 ⁴ | 90,9% | 90,2% |
| ILEO | 1466,85 | 77,8% | 97,6% |
| LINFONODO MEDIASTINICO | 4179,19 | 78,6% | 97,1% |
| TONSILLA | 1,08 X10 ⁴ | 78,6% | 97,6% |
| TOTALE | 2569 | 82,4% | 95,4% |

Tab. 38. Performance della metodica SYBR dopo la definizione di cut-off

Se la maggiore sensibilità della PROBE giustifica di per se stessa la scarsa sensibilità riscontrata assumendo come Gold standard altre metodiche, di più difficile spiegazione risulta lo scarso accordo fra i diversi organi. È tuttavia possibile che minimi livelli di infezione, non rilevabili con le altre tecniche, siano superiori al LOD della PROBE solo in alcuni distretti. Al contrario è meno probabile che titoli più elevati, riscontrabili quindi tramite SYBR e IHC, siano limitati a particolari organi. Tuttavia la mancanza di conoscenza sul reale stato di infezione rende di fatto impossibile esprimersi con certezza sulle performance dei test.

In considerazione del ruolo attribuito all'IHC nella diagnosi di PCVD e dell'accordo fra questa e la rt-PCR SYBR può apparire razionale ipotizzare l'utilizzo di quest'ultima ai fini del rilevamento dell'agente eziologico. Sebbene per la diagnosi di malattia risultino egualmente necessari i riscontri clinici ed istologici, l'utilizzo della metodica in questione risulterebbe egualmente vantaggiosa in termini di costi, praticità, tempi e sensibilità. Ovviamente anche la metodica PROBE, applicati i succitati cut-off, può essere sfruttata a questo fine, con risultati anche migliori. Tuttavia la maggiore complessità della reazione ed in particolare l'utilizzo di due sonde marcate va a gravare inevitabilmente sui costi finali. Al contrario ai fini della diagnosi di

infezione e del monitoraggio del contesto epidemiologico aziendale, anche e soprattutto in assenza di sintomatologia clinica, presenta maggiori vantaggi la metodica PROBE. Valutare la prevalenza dell'infezione, le caratteristiche della circolazione virale, il timing dell'infezione, l'efficacia dei protocolli vaccinali e delle scelte manageriali adottate richiede sovente di confrontarsi con bassi livelli di infezione, rendendo quindi prioritaria un'elevata sensibilità diagnostica.

10. CONCLUSIONI

L'impatto delle malattie ad eziologia multifattoriale sta assumendo una crescente importanza nella suinicoltura intensiva. Fra queste, alcune patologie ad eziologia virale quali le sindromi sostenute da PCV2, hanno determinato un significativo impatto economico su un settore già di per sè in difficoltà. Una delle principali problematiche che riguardano l'approccio a queste sindromi è rappresentata dall'evidenza che PCV2 sia causa necessaria, ma non sufficiente, dello sviluppo di patologia clinica. Da ciò consegue, da un lato, che la sola presenza di infezione non implichi un reale problema per l'allevamento, dall'altro, che la presenza di PCVD non sia attribuibile alla sola circolazione virale ma anche a lacune di varia natura nella gestione dell'allevamento. In tale contesto si integra la crescente importanza di strumenti diagnostici sensibili e specifici, rapidi nel responso ed economici che permettano di aiutare il processo diagnostico e guidare le scelte gestionali.

Il progetto di questa tesi si è quindi prefissato di validare e comparare due metodiche di rt-PCR, come tali teoricamente rispondenti alle caratteristiche sopraccitate, descritte in studi sperimentali, al fine di valutarne l'applicabilità nella pratica diagnostica.

L'impossibilità di individuare soggetti virologicamente negativi non ha permesso di portare a termine la fase inerente la definizione delle caratteristiche analitiche, necessaria per una completa validazione dei due test. La definizione della ripetibilità, della sensibilità e specificità analitica dovranno essere quindi oggetto di una successiva fase sperimentale. Tuttavia prove preliminari eseguite nell'ambito dello sviluppo delle curve standard nonché i risultati ottenuti dalla ripetizione dell'analisi di alcuni campioni sperimentali, pur mancando del rigore metodologico necessario per addurle come prova, hanno fornito risultati incoraggianti, fortemente indicativi del probabile futuro buon esito della validazione. Particolare attenzione è stata dedicata alla possibile interazione fra gli oligonucleotidi utilizzati per la reazione della metodica PROBE ed il genoma di PCV1. Sebbene gli articoli da cui sono state ricavate le sequenze dei primer e della probe (Opriessnig et al., 2003; Opriessnig., 2009c) non riportassero la possibilità di cross-reattività fra le due specie né particolare attenzione fosse dedicata a questa tematica, l'evidenza di interferenza è risultata palese in questo studio. La successiva analisi statistica dei dati ottenuti ha rivelato l'assenza di una reale influenza di PCV1 nella quantificazione dei titoli virali. Tuttavia, a scopo precauzionale, per i futuri esperimenti si consiglia di sfruttare il protocollo caratterizzato da temperatura di annealing/extension pari a 65°C, rivelatasi in grado di evitare in senso assoluto la detection di PCV1 senza pregiudicare le performance della metodica.

Un altro elemento di criticità nella valutazione delle performance delle metodiche confrontate è risultato legato all'impossibilità di definire un reale Gold standard. Sarebbe opportuno per perfezionare le conoscenze su sensibilità e specificità diagnostiche definire dei riferimenti più attendibili rispetto alla sola IHC, rivelatasi carente in sensibilità. Sfortunatamente la rt-PCR, in termini generali, risulta fra le metodiche dotate di maggior sensibilità, rendendo quindi arduo il confronto con un'unica tecnica diagnostica. A conferma della specificità del metodo, una prima misura può essere rappresentata dal sequenziamento sistematico dei campioni risultati positivi. Tuttavia anche in questo caso ci si scontrerebbe inevitabilmente con i limiti di sensibilità associati alla PCR classica ed al sequenziamento. Sarebbe quindi auspicabile la valutazione della metodica nell'ambito di infezioni sperimentali, onde conoscere con certezza il reale stato dell'animale. Questi confronti, associati ad una estesa valutazione della sensibilità e specificità analitica dovrebbero fornire elementi oggettivi per comprovare le potenzialità delle metodiche.

Indipendentemente da queste considerazioni, i dati raccolti permettono egualmente di asserire l'elevata sensibilità dei due test di biologia molecolare confrontati, in accordo con la precedente letteratura (Brunburg et al., 2004; Kim et al., 2004a; Opriessnig et al., 2007b). In particolare la metodica PROBE si è rivelata dotata di grande sensibilità, superiore sia all'IHC che al SYBR, permettendo la detection di titoli dell'ordine di 1 copia/mg di tessuto nonché il riscontro di titoli mediamente superiori di 1,34 gradi logaritmici (dati non mostrati). La presenza dell'internal control in questo test rappresenta inoltre un'ulteriore garanzia contro la presenza di falsi negativi. Al contrario la metodica SYBR offre pregevoli risultati in termini di specificità quando comparata con l'IHC. La definizione di un cut-off ha inoltre permesso di implementare l'accordo fra le diverse metodiche ed in particolare quello fra PROBE ed IHC ottenendo maggiore sensibilità e specificità comparabile con quella osservabile in SYBR. Sarebbe tuttavia lecito porsi l'interrogativo sulla reale utilità di una così spiccata sensibilità. È infatti noto che soggetti anche positivi all'IHC possono non presentare sintomatologia (Krakowka et al., 2005). A maggior ragione bassi titoli virali risultano sostanzialmente trascurabili ai fini clinici. Le metodiche qui studiate si prestano tuttavia ottimamente alla diagnosi di infezione, anche in individui asintomatici. È già stato sottolineato come il semplice stato di infezione possa riverberarsi, direttamente od indirettamente sulle performance produttive. Di ancora maggior importanza risulta la possibilità di conoscere il contesto epidemiologico aziendale e di valutare l'efficacia delle misure di profilassi diretta ed indiretta adottate. Nel primo caso è possibile sfruttare la mortalità naturalmente riscontrata in sala parto, svezzamento e durante le prime fasi dell'ingrasso. Settori questi particolarmente critici per lo sviluppo di PCVD e di altre patologie che possono beneficiare dello stato di immunodepressione indotto da PCV2. Analoghe

considerazioni possono essere fatte per quanto concerne la patologia riproduttiva. In presenza di aborti o natimortalità è infatti presumibile il protrarsi dell'infezione fino a fasi avanzate dello sviluppo fetale, caratterizzate da una distribuzione di PCV2 comparabile a quella dei suinetti (Sanchez et al., 2003; Park et al., 2005). Gli scarsi livelli di mortalità fra gli adulti rendono meno adatta questa metodica ai fini del monitoraggio del loro stato virologico. In tal senso una proposta per il futuro è rappresentata dalla validazione e applicazione dei medesimi o analoghi protocolli anche al siero o al sangue intero onde permettere la diagnosi *in vivo*. La possibilità di quantificare la carica virale offre un importantissimo strumento per valutare l'impatto delle misure di profilassi indiretta messe in atto per limitare l'entità dell'infezione e delle sue manifestazioni. È stato infatti dimostrato come l'introduzione di protocolli vaccinali nonché il rispetto di alcuni requisiti strutturali o gestionali abbiano un'influenza nel rapporto virus-ospite, condizionando sia la replicazione virale che la capacità dell'ospite di opporvisi. Evidentemente ciò si riverbera sui titoli virali riscontrati, fornendo quindi un parametro oggettivo sul quale fondare l'analisi del rapporto costi/benefici. Sotto questo punto di vista la metodica SYBR si presta meno ad un'accurata quantificazione, dovendo essere considerata più propriamente semi-quantitativa. L'impossibilità di integrare il controllo interno, impedendo il monitoraggio della presenza di fattori inibenti, rappresenta altresì un importante limite sia in termini di sensibilità che di accuratezza della quantificazione.

Fra le diverse potenzialità della titolazione virale, vi è quella di poter desumere da questa lo stato clinico dell'animale. L'assenza di dati anamnestici e la scarsità delle informazioni riguardo il quadro anatomopatologico hanno impedito di definire la condizione clinica dei diversi soggetti. Non è stato quindi possibile identificare dei titoli virali definibili come cut-off per lo sviluppo di malattia. Non è altresì corretto ricavare questo valore da precedenti studi ed applicarlo ai risultati ottenuti essendo stata dimostrata una significativa variabilità inter-laboratorio nella quantificazione (Puvanendiran et al., 2011). Con ciò non si vuole negare la possibilità di applicare le due metodiche nella diagnosi di malattia. Fatto salvo l'usuale iter diagnostico, queste possono fare le veci dell'IHC per quanto concerne la rilevazione dell'agente eziologico. La possibilità di definire dei cut-off di positività permette di ottenere infatti in entrambi i casi performances del tutto comparabili all'IHC sia per sensibilità che per specificità, beneficiando nel contempo del minor tempo di processazione di elevati numeri di campioni. In aggiunta è evidente che l'indicazione dei titoli virali, in associazione alla sintomatologia clinica e alle lesioni macroscopiche identificabili in sede necroscopica, può supportare maggiormente il clinico nella diagnosi di quanto non sarebbe possibile conoscendo la sola presenza o assenza di infezione.

La comparazione delle diverse matrici ha permesso di identificare una certa influenza delle stesse sia sulla sensibilità/specificità delle metodiche che sulla quantificazione virale. Tuttavia l'accordo generalmente non elevato fra le matrici sia nel confronto fra metodiche che nell'ambito della stessa metodica fra organi diversi, rende difficile identificare un tessuto d'elezione su cui effettuare la diagnosi. Questo può essere conseguenza sia delle caratteristiche proprie delle matrici che della biologia virale. Le matrici studiate sono state infatti selezionate in quanto rappresentative delle possibili vie di ingresso del virus e della sua patogenesi. Conseguentemente per massimizzare la sensibilità diagnostica si consiglia di processare le diverse matrici analizzate in questo studio.

Sebbene i risultati ottenuti si possano considerare complessivamente soddisfacenti, rimangono ancora molti spunti per il futuro. Imperativo sarà il completamento della validazione nella sua parte analitica e l'introduzione del siero o sangue intero fra le matrici considerate. Significativa risulterebbe l'implementazione del IC come "full-process internal control", al fine di monitorare anche la fase di estrazione degli acidi nucleici. La definizione di valori soglia determinanti lo stato di salute/malattia appare un obiettivo relativamente facile da realizzare e di indubbia utilità clinica. Come per tutte le diagnostiche fondate sul rilevamento dell'acido nucleico sarà importante anche il continuo monitoraggio della popolazione virale, con particolare riferimento all'insorgere di mutazioni nelle sequenze di interesse che potrebbero condizionare la sensibilità del test e l'accuratezza della quantificazione.

Infine di particolare fascino è risultato il riscontro di soggetti identificati come virologicamente positivi sebbene sieronegativi. Trattandosi di animali adulti, per di più allevati assieme ad altri soggetti rivelatisi sieropositivi, appare fortemente improbabile che la positività rilevata in rt-PCR sia adducibile ad un'infezione recente. L'eventuale incapacità di soggetti adulti di montare una risposta immunitaria pur in presenza di viremia ed infezione in diversi tessuti non è, a conoscenza dell'autore, mai stata segnalata e, come tale, meriterebbe sicuramente un futuro e dettagliato approfondimento.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1) Alborali L., 2002. *PMWS and PCV2 Diseases: Brief Epidemiological Updates from all over the World*. 17th IPVS AMES (IOWA).
- 2) Allan GM, Caprioli A, McNair I, Lagan-Tregaskis P, Ellis J, Krakowka S, McKillen J, Ostanello F, McNeilly F., 2007. *Porcine circovirus 2 replication in colostrum-deprived piglets following experimental infection and immune stimulation using a modified live vaccine against porcine respiratory and reproductive syndrome virus*. *Zoon Public Health*, 54:214-222.
- 3) Andraud M, Grasland B, Durand B, Cariolet R, Jestin A, Madec F, Pierre JS, Rose N., 2009. *Modelling the time-dependent transmission rate for porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs using data from serial transmission experiments*. *J R Soc Interface*. Jan 6;6:39-50.
- 4) Bielanski A, Larochelle R, Magar R., 2004. *An attempt to render oocytes and embryos free from the porcine circovirus type 2 after experimental in vitro exposure*. *Can J Vet Res*. Jul;68:222-5.
- 5) Blunt R, McOrist S, McKillen J, McNair I, Jiang T, Mellits K., 2011. *House fly vector for porcine circovirus 2b on commercial pig farms*. *Vet Microbiol*. May 5;149:452-5.
- 6) Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J., 2007. *Cytokines and T-cell homeostasis*. *Curr Opin Immunol*. Jun;19:320-6.
- 7) Bresaola M, Lombardo T, Villa R, Sossi E, Ferrari M., 2010. *Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 and Porcine Circovirus type 2 coinfection in Italian pig sera (from 1990 to 2009)*. *Atti della società italiana di patologia e allevamento dei suini 2010*
- 8) Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM., 2004. *Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR*. *J Virol Methods*. Dec 15;122:171-8.
- 9) Brunborg IM, Jonassen CM, Moldal T, Bratberg B, Lium B, Koenen F, Schönheit J., 2007. *Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study*. *J Vet Diagn Invest*. Jul;19:368-75.
- 10) Brunborg IM, Fossum C, Lium B, Blomqvist G, Merlot E, Jørgensen A, Eliasson-Selling L, Rimstad E, Jonassen CM, Wallgren P., 2010. *Dynamics of serum antibodies to and load of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs in three finishing herds, affected or not by postweaning multisystemic wasting syndrome*. *Acta Vet Scand*. Mar 19;52:22.
- 11) Calsamiglia M, Fraile L, Espinal A, Cuxart A, Seminati C, Martín M, Mateu E, Domingo M, Segalés J., 2007. *Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)*. *Res Vet Sci*. Jun;82:299-304

- 12) Carman S, Cai HY, DeLay J, Youssef SA, McEwen BJ, Gagnon CA, Tremblay D, Hazlett M, Lulis P, Fairles J, Alexander HS, van Dreumel T.,2008. *The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease--2004-2006*. Can J Vet Res. Apr;72:259-268.
- 13) Chae C., 2004. *Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology*. Vet J. Jul;168:41-9.
- 14) Chae C., 2005. *A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases*. Vet J. May;169:326-36.
- 15) Chang HW, Jeng CR, Lin TL, Liu JJ, Chiou MT, Tsai YC, Chia MY, Jan TR, Pang VF., 2006. *Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation*. Vet Immunol Immunopathol. Apr 15;110:207-19.
- 16) Cortey M, Pileri E, Sibila M, Pujols J, Balasch M, Plana J, Segalés J., 2011. *Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008*. Vet J. Mar;187:363-8.
- 17) Darwich L, Segalés J, Domingo M, Mateu E., 2002. *Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues*. Clin Diagn Lab Immunol. Mar;9:236-42.
- 18) Darwich L, Balasch M, Plana-Durán J, Segalés J, Domingo M, Mateu E., 2003a. *Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens*. J Gen Virol. Dec;84:3453-7.
- 19) Darwich L, Pié S, Rovira A, Segalés J, Domingo M, Oswald IP, Mateu E., 2003b. *Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome*. J Gen Virol. Aug;84:2117-25.
- 20) Darwich L, Segalés J, Mateu E., 2004. *Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle*. Arch Virol. May;149:857-74.
- 21) Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, Masuo Y, Agrawal G., 2007. *Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes*. Curr Genomics. Jun;8:234-51.
- 22) Dhanasekaran S, Mark Doherty T, Kenneth J, TB Trias Study Group., 2010. *Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification*. J.Immunol.Methods. 354:34-39

- 23) Doster AR, Subramaniam S, Yhee JY, Kwon BJ, Yu CH, Kwon SY, Osorio FA, Sur JH., 2010. *Distribution and characterization of IL-10-secreting cells in lymphoid tissues of PCV2-infected pigs*. J Vet Sci. Sep;11:177-83.
- 24) Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, B., Magar, R., 2003. *Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia*. Veterinary Pathology 40, 143–148.
- 25) Dupont K, Nielsen EO, Baekbo P, Larsen LE., 2008. *Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time*. Vet Microbiol. Apr 1;128:56-64.
- 26) Dupont K, Hjulsgaard CK, Kristensen CS, Baekbo P, Larsen LE., 2009. *Transmission of different variants of PCV2 and viral dynamics in a research facility with pigs mingled from PMWS-affected herds and non-affected herds*. Vet Microbiol. Nov 18;139:219-26.
- 27) Ellis J., Hassard L., Clark E., Harding J., Allan G., Willson P., Strokappe J., Martin K., McNeilly F., Meehan B., Todd D., Haines D. 1998. *Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome*. Can Vet J 1998; 39: 44-51.
- 28) Ellis, J., 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*. J. Vet. Diagn. Invest. 11, 3–14.
- 29) Ellis J, Spinato M, Yong C, West K, McNeilly F, Meehan B, Kennedy S, Clark E, Krakowka S, Allan G., 2003. *Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar*. J Vet Diagn Invest. Jul;15:364-8.
- 30) Ellis J, Clark E, Haines D, West K, Krakowka S, Kennedy S, Allan GM.,2004. *Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field*. Vet Microbiol. Feb 4;98:159-63.
- 31) Faurez F, Dory D, Grasland B, Jestin A., 2009. *Replication of porcine circoviruses*. Virol J. May 18;6:60.
- 32) Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ., 2004. *Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo*. J Virol. Dec;78:13440-6.
- 33) Finsterbusch T, Mankertz A., 2009. *Porcine circoviruses--small but powerful*. Virus Res. Aug;143:177-83.
- 34) Firth C, Charleston MA, Duffy S, Shapiro B, Holmes EC., 2009. *Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2*. J Virol. Dec;83:12813-21.

- 35) Fort M, Sibila M, Allepuz A, Mateu E, Roerink F, Segalés J., 2008. *Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins*. Vaccine. Feb 20;26:1063-71.
- 36) Fort M, Fernandes LT, Nofrarias M, Díaz I, Sibila M, Pujols J, Mateu E, Segalés J., 2009. *Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets*. Vet Immunol Immunopathol. May 15;129:101-7.
- 37) Fort M, Sibila M, Nofrarias M, Pérez-Martín E, Olvera A, Mateu E, Segalés J., 2010. *Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection*. Vet Immunol Immunopathol. Oct 15;137:226-34.
- 38) Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne MH, Houde A, Elahi SM., 2007. *The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada*. Can Vet J. Aug;48:811-819.
- 39) Gerber PF, Garrocho FM, Lana AM, Lobato ZI., 2011 . *Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows*. Vet J. May;188:240-2.
- 40) Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V., 2009. *Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease*. J Vet Intern Med. Nov-Dec;23:1151-63.
- 41) Gilpin DF, McCullough K, Meehan BM, McNeilly F, McNair I, Stevenson LS, Foster JC, Ellis JA, Krakowka S, Adair BM, Allan GM., 2003. *In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system*. Vet Immunol Immunopathol. Aug 15;94:149-61.
- 42) Grau-Roma L, Hjulsager CK, Sibila M, Kristensen CS, López-Soria S, Enøe C, Casal J, Bøtner A, Nofrarias M, Bille-Hansen V, Fraile L, Baekbo P, Segalés J, Larsen LE., 2009 . *Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark*. Vet Microbiol. Mar 30;135:272-82.
- 43) Grau-Roma L, Fraile L, Segalés J., 2011. *Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2*. Vet J. Jan;187:23-32.
- 44) Grierson SS, King DP, Sandvik T, Hicks D, Spencer Y, Drew TW, Banks M., 2004. *Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK*. Arch Virol. Jun;149:1171-83.
- 45) Ha Y, Jung K, Choi C, Hwang KK, Chae C., 2005. *Synthetic peptide-derived antibody-based immunohistochemistry for the detection of porcine circovirus 2 in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome*. J Comp Pathol. Aug-Oct;133:201-4.
- 46) Harding J.C., Clark E., 1998. *Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)*. Swine Health Prod. 5,201-203.

- 47) Hesse R, Kerrigan M, Rowland RR., 2008. *Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field*. Virus Res. Mar;132:201-7.
- 48) Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M., 2006. *A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses*. J Virol Methods. Sep;136:200-9.
- 49) Hoffmann M, Hurlbaeus J, Weilke C., 2007. *Using the LightCycler 480 System for Discovery and Analysis of Genetic Variation*. GEN Online Dec 1, (Vol. 27, No. 21)
- 50) Jacobsen B, Krueger L, Seeliger F, Bruegmann M, Segalés J, Baumgaertner W., 2009. *Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany*. Vet Microbiol. Jul 2;138:27-33.
- 51) Karlskov-Mortensen P, Kristensen CS, Grau-Roma L, Bille-Hansen V, McNeilly F, Jørgensen CB, Bækbo P, Segalés J, Fredholm M., 2008. *Closing in on a locus with effect on PMWS susceptibility*. In: Proceedings of the 2nd European Conference on Pig Genomics, Ljubljana, Slovenia, pp. 60–61.
- 52) Karuppanan AK, Kwang J., 2011. *ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the virus*. Virology. Feb 5;410:248-56.
- 53) Kekarainen T, McCullough K, Fort M, Fossum C, Segalés J, Allan GM., 2010. *Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2*. Vet Immunol Immunopathol. Aug 15;136:185-93.
- 54) Kim J, Chae C., 2003a. *Optimal enhancement of in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues using a combined pretreatment of thermocycler and proteinase K*. Res Vet Sci. Jun;74:235-40.
- 55) Kim J, Chae C., 2003b. *Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome*. Can J Vet Res. May;67:133-7.
- 56) Kim J, Chung HK, Chae C., 2003c. *Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex*. The Veterinary Journal 166, 251–256.
- 57) Kim J, Han DU, Choi C, Chae C., 2003d. *Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction*. J Vet Med Sci. Jun;65:741-4.
- 58) Kim J, Chae C, 2004a. *A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs*. J Vet Diagn Invest. Jan;16:45-50.
- 59) Kim, J., Chae, C., 2004b. *Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs*. The Veterinary Journal 167, 104–106.

- 60) Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Chae C., 2004c. *Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs*. Can J Vet Res. Jul;68:218-21.
- 61) King D, DuBois P, Painter T, Holck T, Edler R, Johnson C, Diaz E., 2008. *Biologic and economic benefits of controlling subclinical PCVAD with vaccination*. DVM.Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.FLEX Symposium, March 7.
- 62) Kixmüller M, Ritzmann M, Eddicks M, Saalmüller A, Elbers K, Fachinger V., 2008. *Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2*. Vaccine. Jun 25;26:3443-51.
- 63) Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G., 2001. *Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2)*. Vet Pathol. Jan;38:31-42.
- 64) Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, Waldner C, Allan G., 2005. *Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome*. J Vet Diagn Invest. May;17:213-22.
- 65) Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, Waldner C, Rings DM, Allan G., 2007. *Mycoplasma hyopneumoniae bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: induction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease*. Can Vet J. Jul;48:716-24.
- 66) Kristensen CS, Baadsgaard NP, Toft N., 2011. *A meta-analysis comparing the effect of PCV2 vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter*. Prev Vet Med. Mar 1;98:250-8.
- 67) Landis JR, Koch GG., 1977. *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics. Mar;33:159-74.
- 68) Larochelle R, Bielanski A, Müller P, Magar R., 2000. *PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen*. J Clin Microbiol. Dec;38:4629-32.
- 69) Larochelle R, Magar R, D'Allaire S., 2002. *Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions*. Virus Res. Dec;90:101-12.
- 70) LightCycler®480 Instrument Operator's Manual- Software Version 1.5., 2008.
- 71) Liu J, Chen I, Kwang J., 2005. *Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis*. J Virol. Jul;79:8262-74.
- 72) Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, Kwang J., 2006. *The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo*. J Virol. May;80:5065-73.
- 73) Liu J, Zhu Y, Chen I, Lau J, He F, Lau A, Wang Z, Karuppanan AK, Kwang J., 2007. *The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection*. J Virol. Sep;81:9560-7.

- 74) Lopez-Soria S, Segales J, Nofrarias M, Calsamiglia M, Ramirez H, Minguez A, M. Serrano I, Marin O, Callen A., 2004. *Genetic influence on the expression of PCV disease*. Vet. Rec.155:504.
- 75) Lyoo K, Joo H, Caldwell B, Kim H, Davies PR, Torrison J., 2011 .*Comparative efficacy of three commercial PCV2 vaccines in conventionally reared pigs*. Vet J. Jul;189:58-62.
- 76) Mackay IM., 2007. *Real-Time PCR in Microbiology From Diagnosis to Characterization*. Caister Academic Press.
- 77) Madec F, Eveno E, P. Morvan, Hamon L, Blanchard P, Cariolet R, Amenna N, Morvan H, Truong C, Mahe´ D, Albina E, Jestin A.,2000. *Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms*. Livestock Production Science 63:223–233
- 78) Madec F, Rose N, Grasland B, Cariolet R, Jestin A., 2008. *Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience*. Transbound Emerg Dis. Sep;55:273-83.
- 79) Madson DM, Ramamoorthy S, Kuster C, Pal N, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T., 2008. *Characterization of shedding patterns of Porcine circovirus types 2a and 2b in experimentally inoculated mature boars*. J Vet Diagn Invest. Nov;20:725-34.
- 80) Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T., 2009a. *Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of the dam on PCV2 replication in utero*. Clin Vaccine Immunol. Jun;16:830-4.
- 81) Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T., 2009b. *Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2*. Vet Pathol. Jul;46:707-16.
- 82) Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T., 2009c. *Effect of natural or vaccine-induced porcine circovirus type 2 (PCV2) immunity on fetal infection after artificial insemination with PCV2 spiked semen*. Theriogenology. Oct 1;72:747-54
- 83) Madson DM, Ramamoorthy S, Kuster C, Pal N, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T., 2009d. *Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars*. Vet Res. Jan-Feb;40:10.
- 84) Magar R, Müller P, Larochelle R., 2000. *Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2*. Can J Vet Res. Jul;64:184-6.
- 85) Mahé D, Blanchard P, Truong C, Arnauld C, Le Cann P, Cariolet R, Madec F, Albina E, Jestin A., 2000. *Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes*. J Gen Virol. Jul;81:1815-24.
- 86) Mandrioli L, Sarli G, Panarese S, Baldoni S, Marcato PS., 2004. *Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)*. Immunol Immunopathol. Jan;97:25-37.

- 87) Marks FS, Reck J Jr, Almeida LL, Berger M, Corrêa AM, Driemeier D, Barcellos DE, Guimarães JA, Termignoni C, Canal CW., 2010. *Porcine circovirus 2 (PCV2) induces a procoagulant state in naturally infected swine and in cultured endothelial cells.* Vet Microbiol. Feb 24;141:22-30.
- 88) Martelli P, Ferrari L, Morganti M, De Angelis E, Bonilauri P, Guazzetti S, Caleffi A, Borghetti P., 2011. *One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions.* Vet Microbiol. May 5;149:339-51.
- 89) Martin, H., Le Potier, M.F., Maris, P., 2008. *Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2.* Vet J. Sep;177 :388-93.
- 90) Mateusen B, Sanchez RE, Van Soom A, Meerts P, Maes DG, Nauwynck HJ., 2004. *Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection.* Theriogenology. Jan 1;61:91-101
- 91) McCullough KC, Ruggli N, Summerfield A., 2009. *Dendritic cells--at the front-line of pathogen attack.* Vet Immunol Immunopathol. Mar 15;128:7-15.
- 92) McIntosh KA, Harding JC, Parker S, Ellis JA, Appleyard GD., 2006. *Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars.* J Vet Diagn Invest. Jul;18:380-4.
- 93) McIntosh KA, Tumber A, Harding JC, Krakowka S, Ellis JA, Hill JE., 2009. *Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues.* Vet Microbiol. Jan 1;133:23-33.
- 94) McKeown NE, Opriessnig T, Thomas P, Guenette DK, Elvinger F, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ., 2005. *Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2.* Clin Diagn Lab Immunol. Nov;12:1347-51.
- 95) McNeilly F, Kennedy S, Moffett D, Meehan BM, Foster JC, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM, Adair BM, Allan GM., 1999. *Comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).* J Virol Methods. Jul;80:123-8.
- 96) MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION-April 2002. *Control of PMWS and PDNS.*
- 97) Meerts P, Misinzo G, Lefebvre D, Nielsen J, Bøtner A, Kristensen CS, Nauwynck HJ., 2006. *Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease.* BMC Vet Res. Jan 30;2:6.
- 98) Misinzo G, Delputte PL, Meerts P, Lefebvre DJ, Nauwynck HJ., 2006. *Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells.* J Virol. Apr;80:3487-94.

- 99) Misinzo G, Delputte PL, Nauwynck HJ., 2008. *Inhibition of endosome-lysosome system acidification enhances porcine circovirus 2 infection of porcine epithelial cells.* J Virol. Feb;82:1128-35.
- 100) Misinzo G, Delputte PL, Lefebvre DJ, Nauwynck HJ., 2009. *Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion.* Virus Res. Jan;139:1-9.
- 101) Nanodrop-Technical Support bulletin. *260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers.* 2007. NanoDrop Technologies, Inc.
- 102) O'Dea MA, Hughes AP, Davies LJ, Muhling J, Buddle R, Wilcox GE., 2008. *Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture.* J Virol Methods. Jan;147:61-6.
- 103) Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M., 2004. *Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs.* J Virol Methods. Apr;117:75-80.
- 104) Olvera A, Cortey M, Segalés J., 2007. *Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality.* Virology. Jan 20;357:175-85.
- 105) Opriessnig T, Yu S, Gallup JM, Evans RB, Fenaux M, Pallares F, Thacker EL, Brockus CW, Ackermann MR, Thomas P, Meng XJ, Halbur PG., 2003. *Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus.* Vet Pathol. Sep;40:521-9.
- 106) Opriessnig T, Fenaux M, Thomas P, Hoogland MJ, Rothschild MF, Meng XJ, Halbur PG., 2006a. *Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions.* Vet Pathol. May;43:281-93.
- 107) Opriessnig T, Kuster C, Halbur PG., 2006b. *Demonstration of porcine circovirus type 2 in the testes and accessory sex glands of a boar.* J Swine Health Prod 14:42-45.
- 108) Opriessnig. T, McKeown, NE. Harmon, KL, Meng XJ, Halbur PG. 2006c. *Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine.* Clin Vaccine Immunol. 13:923-929.
- 109) Opriessnig T, McKeown NE, Zhou EM, Meng XJ, Halbur PG., 2006d. *Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence.* J Gen Virol. Oct;87:2923-32.
- 110) Opriessnig T., 2007a. *Effect of Subclinical PCV2 Infection on Growth in Young Pigs.* Ingelvac® CircoFLEX™ PCVAD Symposium.
- 111) Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007b. *Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies.* J Vet Diagn Invest. Nov;19:591-615.

- 112) Opriessnig T, Patterson AR, Elsener J, Meng XJ, Halbur PG., 2008. *Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2*. Clin Vaccine Immunol. Mar;15:397-401.
- 113) Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Halbur PG., 2009a. *Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination*. Vaccine. Feb 11;27:1002-7.
- 114) Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Rothschild M, Kuhar D, Lunney JK, Juhan NM, Meng XJ, Halbur PG., 2009b. *Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs*. J Anim Sci. May;87:1582-90.
- 115) Opriessnig T, Patterson AR, Meng XJ, Halbur PG., 2009c. *Porcine circovirus type 2 in muscle and bone marrow is infectious and transmissible to naïve pigs by oral consumption*. Vet Microbiol. Jan 1;133:54-64.
- 116) Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Ramamoorthy S, Meng XJ, Halbur PG., 2010. *Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination*. Vet Microbiol. May 19;142:177-83.
- 117) Pal N, Huang YW, Madson DM, Kuster C, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T.,2008. *Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of porcine circovirus type 2 and an internal control on porcine semen samples*. J Virol Methods. May;149:217-25.
- 118) Park JS, Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Lim JK, Kim SH, Chae C., 2005 . *Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2*. J Comp Pathol. Feb-Apr;132:139-44.
- 119) Park JS, Ha Y, Kwon B, Cho KD, Lee BH, Chae C., 2009. *Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows*. J Comp Pathol. Feb-Apr;140:208-11.
- 120) Patterson AR, Madson DM, Halbur PG, Opriessnig T., 2011. *Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure*. Vet Microbiol. Apr 21;149:225-9.
- 121) Pejsak Z, Podgórska K, Truszczyński M, Karbowski P, Stadejek T., 2010. *Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. Dec;33:1-5
- 122) Pensaert MB, Sanchez RE Jr, Ladekjaer-Mikkelsen AS, Allan GM, Nauwynck HJ., 2004. *Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection*. Vet Microbiol. Feb 4;98:175-83.

- 123) Pestana EA, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen DJ.,2010. *Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics – Real Time PCR Applications*. Springer
- 124) Pogranichniy RM, Yoon KJ, Harms PA, Sorden SD, Daniels M., 2002. *Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome*. J Vet Diagn Invest. Nov;14:449-56.
- 125) Polz MF, Cavanaugh CM., 1998. *Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR*. Appl Environ Microbiol. Oct;64:3724-30.
- 126) Puvanendiran S, Stone S, Yu W, Johnson CR, Abrahante J, Jimenez LG, Griggs T, Haley C, Wagner B, Murtaugh MP., 2011. *Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds*. Virus Res. Apr;157:92-8.
- 127) Racine S, Kheyar A, Gagnon CA, Charbonneau B, Dea S., 2004. *Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use of the protein in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs*. Clin Diagn Lab Immunol. Jul;11:736-41.
- 128) Ramírez-Mendoza H, Castillo-Juárez H, Hernández J, Correa P, Segalés J., 2009. *Retrospective serological survey of Porcine circovirus-2 infection in Mexico*. Can J Vet Res. Jan;73:21-4.
- 129) Resendes AR, Majó N, Segalés J, Mateu E, Calsamiglia M, Domingo M., 2004 . *Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2*. J Gen Virol. Oct; 85:2837-44.
- 130) Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT., 1997. *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*. Anal Biochem. Feb 15;245:154-60.
- 131) Rodríguez-Arrijo GM, Segalés J, Rosell C, Rovira A, Pujols J, Plana-Durán J, Domingo M., 2003. *Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. Mar;50:99-101.
- 132) Rodríguez-Cariño C, Duffy C, Sánchez-Chardi A, McNeilly F, Allan GM, Segalés J.,2011. *Porcine circovirus type 2 morphogenesis in a clone derived from the I35 lymphoblastoid cell line*. J Comp Pathol. Feb-Apr;144:91-102.
- 133) Rose N, Larour G, Le Diguerher G, Eveno E, Jolly JP, Blanchard P, Oger A, Le Dimna M, Jestin A, Madec F., 2003. *Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds*. Prev Vet Med. Nov 12;61:209-25.
- 134) Rosell, C., Segalés, J., Ramos-Vara, J.A., Folch, J.M., Rodríguez-Arrijo, G.M., Duran, C.O., Balasch, M., Plana-Duran, J., Domingo, M., 2000. *Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome*. Veterinary Record 146, 40–43.

- 135) Sanchez RE Jr, Nauwynck HJ, McNeilly F, Allan GM, Pensaert MB., 2001. *Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation*. Vet Microbiol. Nov 8;83:169-76.
- 136) Sanchez RE Jr, Meerts P, Nauwynck HJ, Pensaert MB., 2003. *Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life*. Vet Microbiol. Aug 29;95:15-25.
- 137) Sarli G, Ostanello F, Morandi F, Fusaro L, Bacci B, Nigrelli A, Alborali L, Dottori M, Vezzoli F, Barigazzi G, Fiorentini L, Sala V, Leotti G., 2008. *Diagnosi di PMWS in Italia*. Large Animal Review; 14: 119-126.
- 138) Sarli G, Moranti F, Panarese S, Bacci B, Ferrara D, Fusaro L, Bacci M, Covoni N, Bonilauri P, Lelli D, Leotti G, Vila T, Joisel F, Ostanello F., 2010. *Conventional sows inseminated with artificially PCV2 infected semen*. Atti della società italiana di patologia e allevamento dei suini 2010
- 139) Segalés J, Alonso F, Rosell C, Pastor J, Chianini F, Campos E, López-Fuertes L, Quintana J, Rodríguez-Arriola G, Calsamiglia M, Pujols J, Domínguez J, Domingo M., 2001. *Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)*. Vet Immunol Immunopathol. Aug 30;81:37-44.
- 140) Segalés J, Domingo M, Chianini F, Majó N, Domínguez J, Darwich L, Mateu E., 2004a. *Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs*. Vet Microbiol. Feb 4;98:151-8.
- 141) Segalés J, Rosell C, Domingo M., 2004b. *Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease*. Vet Microbiol. Feb 4;98:137-49.
- 142) Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005a. *Porcine circovirus diseases*. Anim Health Res Rev. 2005 Dec;6:119-42.
- 143) Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M., 2005b. *Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)*. Vet Microbiol. Dec 20;111:223-9.
- 144) Segalés J, Gordon M. Allan, and Domingo M., 2006 *Porcine Circovirus Disease*. DISEASES OF SWINE-9TH EDITION- Cap 14.
- 145) Shen HG, Beach NM, Huang YW, Halbur PG, Meng XJ, Opriessnig T., 2010a. *Comparison of commercial and experimental porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines using a triple challenge with PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and porcine parvovirus (PPV)*. Vaccine. Aug 23;28:5960-6.

- 146) Shen H, Wang C, Madson DM, Opriessnig T., 2010b. *High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America.* Prev Vet Med. Dec 1;97:228-36.
- 147) Shi KC, Guo X, Ge XN, Liu Q, Yang HC., 2010. *Cytokine mRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from piglets experimentally co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2.* Vet Microbiol. Jan 6;140:155-60.
- 148) Shibata I, Okuda Y, Kitajima K, Asai T., 2006. *Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows.* J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. Aug;53:278-80.
- 149) Shuai J, Wei W, Li X, Chen N, Zhang Z, Chen X, Fang W., 2007. *Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from pigs in high-seroprevalence areas in southeastern China.* Virus Genes. Dec;35:619-27
- 150) Steiner E, Balmelli C, Herrmann B, Summerfield A, McCullough K., 2008. *Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting.* Virology. Sep 1;378:311-22.
- 151) Steiner E, Balmelli C, Gerber H, Summerfield A, McCullough K., 2009. *Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs.* BMC Vet Res. Dec 22;5:45.
- 152) Stevenson, G.W., Kiupel, M., Mittal, S.K., Choi, J., Latimer, K.S., Kanitz, C.L., 2001. *Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors.* J Vet Diagn Invest. Jan;13:57-62.
- 153) *The Control of Porcine Circovirus Diseases (PCVDs): Towards Improved Food Quality and Safety.* 2005.Sixth framework programme
- 154) Timmusk S, Fossum C, Berg M., 2006. *Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein.* J Gen Virol. Nov; 87:3215-23.
- 155) Timmusk S, Wallgren P, Brunborg IM, Wikström FH, Allan G, Meehan B, McMenamy M, McNeilly F, Fuxler L, Belák K, Pödersoo D, Saar T, Berg M, Fossum C., 2008. *Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).* Virus Genes. Jun;36:509-520.
- 156) Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W. 1986. *Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus.* Arch Virol. 1986;91:271-6.
- 157) VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM., 2008. *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis.* Biotechniques. Apr;44:619-26.
- 158) Verreault D, Létourneau V, Gendron L, Massé D, Gagnon CA, Duchaine C., 2010. *Airborne porcine circovirus in Canadian swine confinement buildings.* Vet Microbiol. Mar 24;141:224-30.

- 159) Vicente J, Segalés J, Höfle U, Balasch M, Plana-Durán J, Domingo M, Gortázar C., 2004. *Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (Sus scrofa)*. Vet Res. Mar-Apr;35:243-53.
- 160) Vincent IE, Carrasco CP, Herrmann B, Meehan BM, Allan GM, Summerfield A, McCullough KC., 2003. *Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus*. J Virol. Dec;77:13288-300.
- 161) Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, McNair I, McNeilly F, Meehan BM, Cottrell TS, Ellis JA, Allan GM., 2000. *Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2*. J Vet Diagn Invest. Sep;12:400-5.
- 162) Welch, J., Bienek, C., Gomperts, E., Simmonds, P., 2006. *Resistance of porcine circovirus and chicken anemia virus to virus inactivation procedures used for blood products*. Transfusion 46, 1951–1958.
- 163) Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, de Jong MF, Boersma WJ, Elbers AR., 2004. *Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study*. Vet Microbiol. Apr 19;99:203-14.
- 164) 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 2*. J Vet Diagn Invest. Nov;11:530-2.
- 165) Yin SH, Yang SL, Tian H, Wu JY, Shang YJ, Cai XP, Liu XT., 2010. *An ELISA based on a truncated soluble ORF2 protein for the detection of PCV2 antibodies in domestic pigs*. Virol Sin. Jun;25:191-8.
- 166) Yu S, Carpenter S, Opriessnig T, Halbur PG, Thacker E., 2005. *Development of a reverse transcription-PCR assay to detect porcine circovirus type 2 transcription as a measure of replication*. J Virol Methods. Jan;123:109-12.
- 167) Yu S, Opriessnig T, Kitikoon P, Nilubol D, Halbur PG, Thacker E., 2007a. *Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs*. Vet Immunol Immunopathol. Feb 15;115:261-72.
- 168) Yu S, Vincent A, Opriessnig T, Carpenter S, Kitikoon P, Halbur PG, Thacker E., 2007b. *Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro*. Vet Microbiol. Jul 20;123:34-42.

12. SITOGRAFIA

www.thepigsite.com

www.prontuariofarmaceutico.it

www.eurogentec.com

www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2

www.wikipedia.org

www.geospiza.com/finchtv/

13. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il dottor Michele Drigo per la costante disponibilità, per l'aiuto ed i molteplici consigli fornitimi durante tutto lo sviluppo della tesi.

Ringrazio la dottoressa Alessandra Mondin per la gentilezza e la competenza con cui mi ha seguito ed ha cercato di colmare le mie lacune.

Ringrazio Giorgia e Martina per il supporto ed il conforto morale offertomi in particolare all'approssimarsi della laurea.

Vorrei ringraziare di cuore tutte queste persone, in particolare per l'esempio, di dedizione ed entusiasmo, e per l'accoglienza che hanno sempre saputo dimostrarmi in questi due anni.

Ringrazio inoltre la dottoressa Eliana Schiavon ed il dottor Fabio Rampin, nonché tutto il personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per il materiale fornito e soprattutto per il proficuo rapporto di attiva collaborazione e confronto più volte avuto durante il mio lavoro.