



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

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

Validazione ed applicazione di un protocollo basato
su direct PCR per la ricerca di *Mycoplasma*
hyopneumoniae e Porcine circovirus type 3

Relatore: Dott. Michele Drigo

Correlatore: Dott. Giovanni Franzo

Correlatore: Dott. Mattia Cecchinato

Laureando: Legnardi Matteo
Matricola n. 1044771/MV

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

RIASSUNTO

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

La validazione dei rispettivi protocolli ha fornito un utile strumento per lo svolgimento di analisi molecolari fortemente vantaggiose sia a livello di tempo che di costi, il tutto garantendo alte prestazioni diagnostiche.

L'effettiva messa in pratica della metodica ha inoltre permesso di estrapolare numerosi dati sull'epidemiologia di Mhyo e PCV3, in particolare sulla loro circolazione sul territorio italiano, sul fenomeno delle coinfezioni, sulla loro associazione con determinati sintomi clinici e lesioni, sulle matrici nelle quali è possibile rinvenirli e quali categorie produttive risultano più colpite.

Per quanto riguarda PCV3, quello riportato in questa tesi è di fatto il primo rinvenimento a livello europeo. Ciò getta promettenti basi per futuri studi atti a determinare l'esatto ruolo epidemiologico di questo microrganismo emergente.

ABSTRACT

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

Assay validation has provided a useful tool to perform quick and cost-effective molecular analyses.

The procedure has been applied to investigate field samples, thus providing several data on the epidemiology of PCV3 and Mhyo, especially with regard to their circulation in Italy, distribution in different age groups, association with clinical symptoms and necropsy findings, detection in diverse diagnostic matrices and coinfections with other pathogens.

Moreover, this study presents the first European detection of PCV3, a promising basis for future works that will be necessary to clarify the exact epidemiological role of this emerging microorganism.

INDICE

RIASSUNTO	3
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUZIONE.....	9
2. MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE	11
2.1. RILEVANZA	11
2.2. EZIOLOGIA.....	12
2.3. EPIDEMIOLOGIA.....	12
2.4. PATOGENESI.....	14
2.5. SEGNI CLINICI	15
2.6. LESIONI.....	16
2.7. DIAGNOSI.....	16
2.8. TRATTAMENTO	19
2.9. PREVENZIONE.....	19
3. CIRCOVIRUS SUINI: PCV1, PCV2 E PCV3	23
3.1. RILEVANZA	23
3.2. IL GENERE CIRCOVIRUS.....	23
3.3. PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 1 (PCV1)	24
3.4. PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2)	25
3.5. PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 (PCV3)	31
4. MATERIALI E METODI.....	35
4.1. CAMPIONI.....	35
4.2. DATABASE.....	35
4.3. DISEGNO DEI PRIMER.....	36
4.4. PROTOCOLLO PCR	37
4.5. ELETTROFORESI SU GEL	39
4.6. ANALISI STATISTICA.....	39
5. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	41
5.1. VALIDAZIONE DEL PROTOCOLLO	41
5.2. INDAGINI SU CAMPIONI SPERIMENTALI E ANALISI STATISTICA	42
5.2.1. <i>DISTRIBUZIONE</i>	43
5.2.2. <i>MATRICI</i>	44
5.2.3. <i>CATEGORIE PRODUTTIVE</i>	47
5.2.4. <i>COINFEZIONI</i>	49
5.2.5. <i>SINTOMI E REPERTI NECROSCOPICI</i>	52
5.2.6. <i>SEQUENZIAMENTO DI PCV3</i>	56
6. CONCLUSIONI.....	59
7. BIBLIOGRAFIA	63
8. SITOGRAFIA	87
9. RINGRAZIAMENTI.....	89

1. INTRODUZIONE

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

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

Il primo obiettivo di questo progetto è stato la validazione di protocolli basati su *direct PCR* per la ricerca di patogeni rilevanti in ambito suinicolo. La scelta dei microorganismi da studiare è ricaduta su *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Porcine circovirus type 3* (PCV3), ritenuti rappresentativi di due situazioni epidemiologiche notevolmente differenti: il primo è un batterio la cui centralità nell'eziopatogenesi delle affezioni respiratorie del suino è ben documentata, annoverato tra i patogeni con il maggior impatto

economico sul settore; il secondo è un virus scoperto da meno di un anno, la cui importanza epidemiologica, anche e soprattutto per via dei molti punti di contatto con il ben più noto PCV2, è potenzialmente notevole ma ancora tutta da provare.

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

Al fine di ottimizzare la comprensione delle ragioni che motivano questo studio e delle implicazioni dei risultati ottenuti, nei prossimi due capitoli verranno discussi più nello specifico i microrganismi oggetto della ricerca. Per meglio sottolineare le caratteristiche alla base della potenziale rilevanza di PCV3, considerando sia l'esiguità della letteratura prodotta in merito sia il fatto che le attenzioni ad esso rivolte dipendono soprattutto dai punti di contatto col ben più noto PCV2, si è scelto di contestualizzarne la trattazione all'interno del più ampio ambito dei circovirus suini.

2. MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE

2.1. RILEVANZA

Mycoplasma hyopneumoniae (Mhyo) è l'agente eziologico principale della polmonite enzootica, una affezione respiratoria del suino diffusa a livello mondiale e caratterizzata da andamento cronico, eziologia multifattoriale, alta morbilità e bassa mortalità. Sebbene possa colpire suini di tutte le età, essa è difficilmente osservata in individui sotto le 6 settimane di vita. I sintomi includono una tosse secca non produttiva cronica, una riduzione dell'accrescimento giornaliero ed un peggioramento dell'indice di conversione alimentare. In forme complicate si possono aggiungere piressia, dispnea, prostrazione e anoressia, con esiti talvolta mortali (Maes et al., 1996): Mhyo è infatti considerato un vero e proprio “door-opener” per patogeni secondari, tra i quali figurano *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* e *Arcanobacter pyogenes* (Thacker and Minion, 2012).

Mhyo gioca inoltre un ruolo chiave nel complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC), il quale colpisce tipicamente i soggetti in accrescimento ed in finissaggio causando tosse, dispnea, anoressia, febbre e riduzione dell'accrescimento giornaliero (Sibila et al., 2009). Nel determinismo del PRDC, giocano un ruolo rilevante sia virus – principalmente *Porcine circovirus type 2* (PCV2), *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) e *Swine influenza virus* (SIV)- sia batteri - tra cui tutti i patogeni potenzialmente coinvolti nella polmonite enzootica. PCV2, PRRSV e Mhyo sono ritenuti gli agenti eziologici clinicamente più rilevanti e le loro interazioni sono ben documentate (Chae, 2016).

Mhyo è quindi responsabile di ingenti perdite economiche per la suinicoltura mondiale, adducibili principalmente ad un peggior indice di conversione dell'alimento e ad un minor accrescimento giornaliero, oltre che a maggiori costi veterinari e in rari casi ad un aumento del tasso di mortalità (Maes et al., 1998). Le attuali misure adottate per controllare la polmonite enzootica, che consistono solitamente nel combinare un management ottimale all'uso di antimicrobici ed alla vaccinazione, non sono considerate in grado di debellare la malattia, per quanto i benefici a livello economico siano indubbi (Simionatto et al., 2013).

2.2. EZIOLOGIA

Mhyo appartiene alla classe *Mollicutes*, ordine *Mycoplasmatales*, famiglia *Mycoplasmataceae*. La classe *Mollicutes* raggruppa eubatteri privi di parete cellulare e filogeneticamente vicini ai Gram-positivi (Thacker and Minion, 2012). I micoplasmi sono i microorganismi più piccoli capaci di vita libera e di replicazione autonoma, e possiedono un genoma piccolo (580-1530 kb) con un basso contenuto di G+C (24-33 mol%); l'esiguità dei *pathway* metabolici a loro disposizione li rende fortemente dipendenti dall'approvvigionamento esogeno di aminoacidi, purine e pirimidine (Razin et al., 1998): sono quindi tipici batteri *fastidious*, di difficile coltura, con una crescita in vitro che oltre ad essere molto lenta necessita di terreni selettivi, il più utilizzato dei quali è ad oggi quello sviluppato da Niels Friis nel 1975 (Cook et al., 2016).

È stata attestata la presenza di differenze a livello antigenico (Assunção et al., 2005), proteomico (Calus et al., 2007), cromosomico (Frey et al., 1992) e genomico (Madsen et al., 2007) tra diversi ceppi di Mhyo. Sono stati sequenziati i genomi del ceppo 232 (Minion et al., 2004), del ceppo 168 (Liu et al., 2011), del ceppo J e del ceppo 7448 (Vasconcelos et al., 2005). La topografia delle proteine di superficie (tra cui adesine, moduline e un gran numero di lipoproteine) è variabile, in modo da evadere la risposta immunitaria (Browning et al., 2011), e ciò avviene per *cleavage* al momento della traslocazione (Bogema et al., 2011; Burnett et al., 2006; Tacchi et al., 2016).

I ceppi sono inoltre differenziabili per virulenza e sono quindi stati classificati in scarsamente, moderatamente e fortemente virulenti sulla base degli esiti di infezioni sperimentali (Vicca et al., 2003).

2.3. EPIDEMIOLOGIA

Mhyo è un patogeno ospite-specifico che infetta unicamente il suino. La trasmissione avviene principalmente tramite contatto diretto (Thacker and Minion, 2012), con il batterio che è stato isolato nei secreti nasali (Calsamiglia et al., 1999; Goodwin, 1972). Inoltre, in condizioni sperimentali, sono stati dimostrati la trasmissione tramite aerosol fino a 150 m (Cardona et al., 2005) ed il trasporto per via aerea con mantenimento dell'infettività fino a 9,2 km (Otake et al., 2010).

L'infezione da Mhyo ha tipicamente una presentazione endemica, con un inizio subdolo a livello di *nursery*, uno spread molto lento e dei segni clinici lievi. Una rara forma epizootica può avvenire in popolazioni immunologicamente naïve ed in questo caso si avrà una rapida diffusione a soggetti di tutte le età, con morbilità anche del 100% e occasionali decessi, prima della transizione ad un pattern enzootico entro 2-5 mesi (Thacker and Minion, 2012).

Il mantenimento dell'infezione all'interno della popolazione è adducibile alla trasmissione verticale diretta, attenuabile ma non eliminabile con strategie di svezzamento precoce. Le scrofe più interessate sono le primipare, con lo *shedding* che diminuisce all'aumentare dei parti (Calsamiglia and Pijoan, 2000). In sistemi produttivi a flusso continuo in cui non si adottano pratiche di *all-in/all-out* la trasmissione orizzontale da suini più grandi e infetti a soggetti più giovani può giocare un ruolo determinante (Maes et al., 2008). I suinetti infetti sono responsabili di un lento *spread* ai compagni di nidiata e successivamente di box: è stato stimato che durante l'intera lattazione ogni suinetto infetto trasmette Mhyo ad un solo altro individuo (Meyns et al., 2004). L'infezione può persistere fino a 214 giorni; gli animali eliminano Mhyo sia in fase di incubazione, sia nella fase sintomatica e possono risultare portatori asintomatici una volta guariti (Pieters et al., 2009). Il trasporto di Mhyo per mezzo di vettori inanimati, per quanto possibile, è considerato di scarsa importanza rispetto al contatto diretto (Batista et al., 2004). Si ritiene che l'introduzione di Mhyo all'interno di un allevamento avvenga principalmente tramite l'acquisto di animali subclinici e in misura minore per via aerea (Sibila et al., 2009). L'infezione con ceppi a bassa virulenza non conferisce cross-protezione nei confronti di quelli ad alta virulenza, anzi la severità dei segni clinici sembra aumentare nel caso di infezioni ripetute (Villarreal et al., 2009).

Uno studio ritenuto rappresentativo della situazione suinicola europea ha individuato vari fattori di rischio collegati ad una maggiore probabilità di trasmissione verticale, tra cui: un numero di scrofe introdotte come rimonta esterna ogni anno superiore a 120, la presenza di più di 16 box per ogni sala parto, l'assenza di gestione in bande o l'adozione di bande (tipicamente da 2 o da 4 settimane) difficili da sincronizzare con l'estro naturale (Nathues et al., 2013). L'organizzazione a tre siti produttivi aiuta invece a contrastare la trasmissione orizzontale rispetto a quella a una o due siti (Sibila et al., 2004). Negli allevamenti multisito i focolai tendono ad essere più acuti che nei monosito, oltre ad

interessare selettivamente gli animali a fine ciclo (Giacomini et al., 2016; Sibila et al., 2004).

La presenza dell'infezione è stata attestata in popolazioni di cinghiali selvatici con dinamiche e fattori di rischio sovrapponibili a quelli riscontrati nel suino domestico, ma l'eventualità che possano agire come *reservoir* è ritenuta poco probabile (Batista Linhares et al., 2015).

2.4. PATOGENESI

La patogenesi di Mhyo non risulta ancora pienamente compresa, soprattutto per quanto riguarda i fattori di virulenza (Simionatto et al., 2013). Una volta inalato, Mhyo colonizza l'apparato respiratorio aderendo all'epitelio ciliato: causa così ciliostasi, *clumping* delle ciglia e distruzione dell'epitelio (DeBey and Ross, 1994), determinando una drastica riduzione dell'efficienza della *clearance* mucociliare. Il gruppo di adesine coinvolte nel meccanismo di *attachment* include numerose proteine codificate da geni paraloghi, tutte coinvolte in complessi meccanismi di *cleavage* a seguito della loro traslocazione sulla superficie (Adams et al., 2005; Djordjevic et al., 2004): P97, codificata da mhp183; P102, codificata da mhp182 (localizzato sullo stesso operone di mhp183) (Seymour et al., 2012); P159, codificata da mhp493 (Burnett et al., 2006); P135, codificata da mhp683 (Bogema et al., 2011); F1, F2 ed F3, codificate da mhp107 (Seymour et al., 2011); P116, codificata da mhp108 (Seymour et al., 2010). Si parla di adesine multifunzionali poiché le loro capacità di *binding* non si limitano alle cellule ciliate, ma includono anche plasminogeno, eparina e fibronectina, conferendo loro un ruolo importante nel determinare la virulenza (Seymour et al., 2010). P97 è stata la prima adesina ad essere identificata, e la sua centralità nel processo patogenetico è stata dimostrata appurando come l'adesione di Mhyo alle ciglia fosse inibita in vitro da anticorpi monoclonali che riconoscessero P97 (Zhang et al., 1995); ciononostante, una vaccinazione contro il gene mhp1 risulta solo minimamente protettiva (King et al., 1997).

Mhyo ha un'azione immunomodulatrice solo parzialmente compresa: da una parte riduce la capacità fagocitica dei macrofagi (Caruso and Ross, 1990) ed altera la risposta cellulomediata, come prova il fatto che i linfociti T che si accumulano a livello respiratorio dando iperplasia linfoide risultino scarsamente sensibilizzati nei confronti di Mhyo

(Messier and Ross, 1991); dall'altra stimola il rilascio da parte di linfociti e macrofagi di citochine proinfiammatorie, tra cui IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α (Lorenzo et al., 2006; Rodríguez et al., 2004). La prolungata risposta infiammatoria così evocata sembra la principale responsabile del danno tissutale, ancor di più dell'azione diretta del patogeno (Thacker and Minion, 2012).

La riduzione della clearance data dai congiunti effetti immunosoppressivo e ciliostatico, oltre a permettere la cronicizzazione dell'infezione, favorisce l'invasione da parte dei patogeni secondari coinvolti nell'eziologia della polmonite enzootica: i più frequentemente riscontrati tra i batteri (da soli o in associazione) sono *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*, ma si ritrovano anche *Arcanobacterium pyogenes*, *Haemophilus parasuis* e *Streptococcus suis* (Maes et al., 1996; Thacker and Minion, 2012). Sono descritte interazioni con alcuni patogeni virali a tropismo respiratorio: l'infezione con PCV2 aumenta l'incidenza e la severità delle infezioni da Mhyo (Dorr et al., 2007) e viceversa (Opriessnig et al., 2004); la polmonite causata da PRRSV è potenziata dalla coinfezione con Mhyo (Thacker et al., 1999), ma non il contrario (Van Alstine et al., 1996); il virus della pseudorabbia (PRV) potenzia la severità della polmonite da Mhyo (Shibata et al., 1998); la coinfezione con SIV e Mhyo dà lesioni più gravi rispetto ai singoli patogeni, ma l'effetto di potenziamento reciproco non è comparabile a quello riscontrabile coi virus succitati (Thacker et al., 2001; Yazawa et al., 2004).

Mhyo non è un patogeno dal tropismo esclusivamente respiratorio, come dimostra l'isolamento a livello di vari organi quali fegato, reni, milza e linfonodi: ciò è suggestivo di una possibile disseminazione ematogena o linfatica, la quale sembra però essere transitoria e non coinvolta nello sviluppo della polmonite enzootica (Marois et al., 2007).

2.5. SEGNI CLINICI

La polmonite causata da *Mycoplasma hyopneumoniae* può presentarsi nella classica forma enzootica o più raramente in quella epizootica. Nella forma epizootica i segni clinici includono tosse, stress respiratorio, piressia e morte, con una diffusione rapida in tutte le fasce d'età. Nella forma enzootica non complicata si osserva un decorso subclinico caratterizzato da una tosse secca non produttiva più evidente in animali eccitati, della

durata di 2 o 3 settimane o persistente per tutto il periodo di accrescimento, a volte accompagnata da lievi piressia ed anoressia; a livello di popolazione si osserverà un lento e graduale *spread* della tosse ed uno stato di salute generalmente buono, ma l'accrescimento risulterà più disomogeneo. In caso di coinfezione con patogeni secondari si avrà la comparsa di segni clinici più severi, tipicamente tosse produttiva, febbre alta, prostrazione, respiro affannoso e morte (Maes et al., 1996; Thacker and Minion, 2012).

2.6. LESIONI

Le lesioni a livello polmonare, per quanto non patognomiche, vengono comunemente usate per stimare la prevalenza della malattia e valutarne l'impatto economico tramite *scoring* delle carcasse alla macellazione (Sibila et al., 2009).

Le lesioni macroscopiche sono localizzate nelle porzioni cranioventrali dei polmoni e consistono in un consolidamento con pattern lobulare e colore violaceo-grigiastro, nella presenza di essudato catarrale nelle vie aeree e in un aspetto uniforme al taglio, oltre che in un ingrossamento dei linfonodi tracheobronchiali. Nelle forme complicate le aree atelettasiche sono più estese e si ritrova essudato mucopurulento negli alveoli e nelle vie aeree (Thacker and Minion, 2012).

I reperti microscopici includono manicotti peribronchiali e peribronchiolari formati da macrofagi e linfociti, essudato prevalentemente neutrofilico contenente densi aggregati di batteri nelle vie aeree, perdita delle ciglia ed esfoliazione dell'epitelio ciliato (Maes et al., 1996; Thacker and Minion, 2012).

Nelle lesioni in via di guarigione si osservano alveoli sia enfisematosi che collassati e fibrosi interstiziale (Thacker and Minion, 2012).

2.7. DIAGNOSI

La diagnosi clinica di polmonite enzootica è basata sull'osservazione di animali presentanti una tosse cronica non produttiva, valutabili per mezzo di appositi "*coughing score*"; trattandosi di un segno estremamente aspecifico e non esibito da suini affetti a livello subclinico, questo tipo di indagine permette di formulare solo una diagnosi di sospetto (Sibila et al., 2009).

Lo *scoring* delle lesioni polmonari alla macellazione può essere utile per valutare l'incidenza della polmonite enzootica ed il suo impatto economico, ma si tratta comunque di un metodo limitato dalla sua soggettività e dall'aspecificità delle lesioni, le quali per essere rilevate devono essere croniche e possono non venir rilevate in animali guariti (Sibila et al., 2009; Sørensen et al., 1997); è stato riportato che per una stima affidabile della prevalenza e della severità della malattia a livello di popolazione sia necessario esaminare i polmoni di almeno 30 carcasse (Davies et al., 1995).

La metodica colturale è considerata il *gold standard* per la diagnosi di Mhyo, con specificità simile ma maggior sensibilità rispetto ad alternative quali PCR, ELISA ed immunofluorescenza (Sørensen et al., 1997); il suo impiego routinario è però limitato dalla sua indagnosità, dal fatto che l'isolamento richiede 4-8 settimane e un terreno selettivo (Cook et al., 2016; Friis, 1975) e dalla possibile sovracrescita di altri micoplasmi come *M. hyorhinis* o *M. flocculare* (Maes et al., 1996).

La sierologia è comunemente usata per determinare lo stato epidemiologico a livello di popolazione, tramite tecniche ELISA o sempre più raramente di fissazione del complemento, ma pone dei problemi interpretativi laddove venga usata per accertare la positività di un singolo animale (Sørensen et al., 1997; Thacker and Minion, 2012). I test ELISA correntemente usati sono caratterizzati da eccellente specificità ma scarsa sensibilità, risultando particolarmente inefficienti nel rivelare gli anticorpi nelle fasi precoci dell'infezione (Erlandson et al., 2005). Inoltre, l'utilità della sierologia è inficiata da vari fattori quali l'eventualità di *crossreaction* dovuta agli anticorpi contro *Mycoplasma flocculare* (Bereiter et al., 1990), l'impossibilità di differenziare l'infezione naturale dalla vaccinazione, la non ottimale sensibilità diagnostica e l'imprevedibilità della durata dell'intervallo tra l'infezione e la sieroconversione (3-9 settimane in condizioni di campo) (Sibila et al., 2009).

La ricerca degli antigeni di Mhyo a partire dal tessuto polmonare è possibile tramite immunoistochimica e immunofluorescenza sia diretta che indiretta, ma queste metodiche non sono utilizzate di routine poiché possono essere condotte solo *postmortem* e a causa della loro limitata sensibilità, fortemente dipendente dalla quantità di tessuto testato e dalla sua corretta conservazione e processazione (Cai et al., 2007; Thacker and Minion, 2012).

Nell'ambito della diagnostica molecolare, l'avvento della PCR ha indiscutibilmente fornito una soluzione vantaggiosa e di largo impiego alle difficoltà insite nella diagnosi di Mhyo, mentre l'applicabilità dell'ibridazione in situ è stata dimostrata in condizioni sia sperimentali che di campo, ma vi si fa scarsamente ricorso per via delle tempistiche poco convenienti e del suo richiedere campioni postmortali (Kwon and Chae, 1999; Sibila et al., 2009); varie tecniche di tipizzazione molecolare hanno trovato impiego nella valutazione della variabilità genetica ed antigenica di Mhyo e di come essa influenzi la trasmissione e la virulenza, oltre che l'efficacia dei vaccini e delle stesse tecniche diagnostiche (Mayor et al., 2007; Stakenborg et al., 2006b, 2005); più recentemente sono state testate con successo anche procedure di amplificazione isotermica mediata da *loop* (LAMP) (Liu et al., 2015). Molti metodi che sfruttano PCR sono stati validati (Artiushin et al., 1993; Baumeister et al., 1998; Blanchard et al., 1996; Cai et al., 2007; Caron et al., 2000; Harasawa et al., 1991; Mattsson et al., 1995; Stemke et al., 1994), inclusi saggi basati su *real time PCR* (Dubosson et al., 2004; Fablet et al., 2010; Marois et al., 2010; Strait et al., 2008) nonché su *multiplex PCR* (in grado di identificare anche *M. hyorhinis* e *M. flocculare*) (Stakenborg et al., 2006a), anche se è la PCR *nested* a trovare la maggior applicazione grazie ai benefici in termini di sensibilità (Calsamiglia et al., 1999; Kurth et al., 2002; Stark et al., 1998; Thacker and Minion, 2012; Verdin et al., 2000). I campioni da sottoporre a PCR sono ottenibili in vivo tramite tamponi nasali o tracheali, *brushing* orofaringeo, lavaggi tracheobronchiali o broncoalveolari, e tra questi i più sensibili risultano essere il BALF ed il tampone tracheale (che è però più ragionevolmente praticabile in condizioni di campo) (Fablet et al., 2010); a questi metodi si aggiunge la possibilità di campionare l'aria tramite filtrazione (Stark et al., 1998) ed i polmoni alla necropsopia, ma le prestazioni ottenute a partire dal tessuto polmonare sono controverse (Kurth et al., 2002; Moorkamp et al., 2008). Le controindicazioni della PCR includono l'elevato rischio di falsi positivi dovuti a contaminazioni, l'impossibilità di determinare se il materiale genetico rilevato derivi da organismi vivi o morti (e quindi se l'infezione sia o meno in corso) e l'eventualità che la diversità genetica di Mhyo possa esitare in falsi negativi (Thacker and Minion, 2012).

In conclusione, il modo migliore per ottimizzare l'accuratezza diagnostica attualmente è combinare ELISA, PCR e *scoring* delle lesioni polmonari (Sibila et al., 2009).

2.8. TRATTAMENTO

Numerosi antibiotici si sono dimostrati efficaci nel controllo delle infezioni da Mhyo, senza però essere in grado di eliminare l'organismo dal tratto respiratorio o di guarire le lesioni preesistenti (Thacker and Minion, 2012): la tilosina, la tilmicosina, la tilvalosina, i lincosamidi, vari chinoloni, la tulatromicina, la lefamulina e varie tetracicline sono stati testati in vitro con esito positivo (Cooper et al., 1993; Godinho, 2008; Hannan et al., 1989; Tanner et al., 1993; Tavio et al., 2014; Ter Laak et al., 1991; Waites et al., 2017; Williams, 1978; Wu et al., 1997). Lo studio dell'attività in vivo, che presuppone la capacità della molecola di raggiungere concentrazioni sufficienti a livello dell'epitelio ciliato del tratto respiratorio, ha prodotto risultati più ambigui (Hannan and Goodwin, 1990; Le Carrou et al., 2006; Ross and Cox, 1988). Lo sviluppo di resistenza ad uno o più antibiotici in ceppi di campo è stata osservata in vitro (Stakenborg et al., 2005; Vicca et al., 2004, 2007), ma non sembra avere ancora raggiunto livelli allarmanti (Maes et al., 2008). La combinazione di più antibiotici ha dato risultati positivi, vista anche la frequente necessità di combattere i patogeni secondari (Burch et al., 1986; Stipkovits et al., 2001). L'uso di florfenicolo come additivo nel mangime in popolazioni affette da polmonite enzootica si è dimostrato efficace nel ridurre la severità dei segni clinici (Ciprián et al., 2012). Il cloruro di litio (LiCl), composto normalmente usato per trattare i disordini bipolari ma dalle già conosciute proprietà chemioterapiche, si è provato in grado di inibire l'infezione da Mhyo in vitro tramite un meccanismo antiapoptotico (Ishag et al., 2016).

2.9. PREVENZIONE

La prevenzione è di gran lunga più efficace del trattamento nel ridurre l'impatto economico di Mhyo (Thacker and Minion, 2012) e può essere ottenuta tramite diverse combinazioni di soluzioni manageriali, protocolli vaccinali, terapie antibiotiche strategiche (attualmente scoraggiate) ed eventuali piani di eradicazione (Maes et al., 2008).

L'aspetto più importante è dato dall'ottimizzazione del management e delle condizioni di stabulazione: la messa in pratica dell'*all-in/all-out* è il fattore più importante, ma risultano cruciali anche il contenimento del tasso di rimonta, l'acquisto di animali solo da allevamenti con status sanitario pari o superiore, un acclimatemento di almeno 30 giorni,

una densità di popolazione non eccessiva, il mantenimento di adeguate condizioni di temperatura e ventilazione, la minimizzazione dello stress, l'adozione di stringenti misure di biosicurezza e la contemporanea lotta agli altri patogeni coinvolti nella polmonite enzootica e nel PRDC; inoltre, i sistemi di produzione monosito e con un numero elevato di capi risultano maggiormente a rischio d'infezione (Maes et al., 2008).

La vaccinazione è utilizzata in tutto il mondo sotto forma di preparazioni commerciali adiuvate per ridurre la severità dei segni clinici, l'entità delle lesioni respiratorie, i costi veterinari e soprattutto le perdite nell'ambito dell'accrescimento giornaliero, dell'indice di conversione dell'alimento e del tasso di mortalità (Maes et al., 2008, 1999, 1998). Nonostante questi vantaggi, la profilassi indiretta non è in grado di prevenire la colonizzazione del tratto respiratorio (Thacker et al., 1998) né di diminuire in modo significativo la trasmissione, ed è quindi insufficiente ad eliminare Mhyo da una popolazione infetta se non combinata con provvedimenti manageriali ed eventualmente terapie antibiotiche (Haesebrouck et al., 2004; Meyns et al., 2006). Solitamente negli allevamenti monosito si preferisce una vaccinazione precoce (prima delle 4 settimane di età), mentre nei sistemi multisito, in cui le infezioni tendono ad interessare le fasi finali del ciclo, si vaccina tendenzialmente tra le 4 e le 10 settimane d'età (Maes et al., 2008); più controversa è la vaccinazione delle scrofe a fine gestazione, col doppio obiettivo di ridurre lo *shedding* da parte delle madri e di proteggere la prole attraverso il passaggio di anticorpi materni: il ruolo dell'immunità passiva è infatti sconosciuto e i suinetti restano a rischio di infezione, per quanto i segni clinici risultino attenuati (Sibila et al., 2008; Thacker and Minion, 2012). Gli attuali protocolli *one-shot* e quelli con richiamo offrono performance simili, con la singola somministrazione che viene preferita in quanto meno laboriosa e stressante per gli animali, ma anche più rischiosa se non fatta da operatori esperti (Morris et al., 2001). Tutti i vaccini disponibili in commercio sono ricavati da batteri uccisi sospesi in adiuvanti dalla composizione variabile. Essendo perlopiù basati sul ceppo J, eventuali differenze antigeniche tra quest'ultimo ed i ceppi circolanti potrebbero essere responsabili almeno in parte della variabile efficacia riscontrata in campo (Simionatto et al., 2013); tra gli altri possibili fattori responsabili del diverso effetto del vaccino rientrano le condizioni di stoccaggio, la presenza dell'infezione al momento della somministrazione e l'interferenza con gli anticorpi materni, per quanto questi ultimi sembrano essere un problema solo se presenti a titoli molto elevati (Maes et

al., 2008; Martelli et al., 2006). L'efficacia del vaccino sembra essere ridotta dalla coinfezione con PRRSV, mentre l'effetto della vaccinazione contro PRRSV su quella contro Mhyo sembra dipendere dal momento in cui vengono svolte (Boettcher et al., 2002; Bourry et al., 2015; Chae, 2016; Thacker et al., 2000). Nell'ambito del controllo del PRDC, la vaccinazione per Mhyo è prioritaria rispetto a quella per PRRSV qualora si abbia una coinfezione, mentre in caso di infezione da Mhyo sommata ad una da PCV2 i suini andrebbero vaccinati nei confronti di entrambi i patogeni (Chae, 2016).

In definitiva, ad un'analisi costi/benefici la vaccinazione risulta economicamente vantaggiosa (al netto di inevitabili fluttuazioni di mercato) anche per allevamenti sottoposti a basse pressioni infettive (Maes et al., 2003). Ciononostante, le limitazioni dei vaccini attualmente disponibili stimolano la ricerca di soluzioni alternative (Simionatto et al., 2013), tra cui figurano vaccini vivi attenuati (Xiong et al., 2014), ricombinanti e a DNA (Chen et al., 2008; Galli et al., 2012), oltre che somministrabili per vie potenzialmente più vantaggiose di quella intramuscolare come l'aerosol (Feng et al., 2013) e quella orale (Lin et al., 2002).

La somministrazione preventiva di antibiotici nell'alimento o nell'acqua di abbeverata, per 1-3 settimane a partire da una settimana prima della prevista esposizione al patogeno (Thacker et al., 2006) o in modo intermittente nei periodi più stressanti (Le Grand and Kobisch, 1996; Mateusen et al., 2001), per quanto di comprovata utilità e di applicazione ancora estensiva, dovrebbe essere limitata alla luce delle emergenti evidenze di antibiotico-resistenza, oltre che per l'aumentato rischio di residui nelle carcasse (Maes et al., 2008; Thacker et al., 2006); questa pratica è comunque considerata un'alternativa meno performante alla vaccinazione da un punto di vista sia medico che economico e, proprio come la vaccinazione, non è in grado di prevenire la colonizzazione del tratto respiratorio (Le Grand and Kobisch, 1996).

L'eradicazione di Mhyo è stata perseguita con varie strategie, che vanno dallo *stamping out* seguito dal ripopolamento con popolazioni *Mhyo-free* a protocolli di svezzamento precoce congiunti al trattamento puerperale delle scrofe con antibiotici, ottenendo significativi risultati (ma non riuscendo a impedire sporadici casi di successiva reinfezione) in Svizzera, Danimarca e Finlandia (Baekbo et al., 1996; Hege et al., 2002; Heinonen et al., 1999; Maes et al., 2008; Mészáros et al., 1985; Rautiainen et al., 2001).

3. CIRCOVIRUS SUINI: PCV1, PCV2 e PCV3

3.1. RILEVANZA

Tra i circovirus infettanti i suini si annoverano tre diverse specie: *Porcine circovirus 1* (PCV1), *Porcine circovirus 2* (PCV2) ed il recentemente scoperto *Porcine circovirus 3* (PCV3), il quale non risulta ancora inserito ufficialmente nella tassonomia redatta dall'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (<https://talk.ictvonline.org>). Mentre l'importanza dell'apparentemente apatogeno PCV1 è marginale (Puvanendiran et al., 2011; Tombácz et al., 2014), a partire dagli anni '90 PCV2 è emerso come uno dei principali patogeni ad affliggere la produzione suinicola mondiale, responsabile di ingentissime perdite economiche dovute ad un complesso di malattie descritte collettivamente come *Porcine circovirus associated disease* (PCVAD) (Alarcon et al., 2013; Meng, 2012). Per quanto riguarda PCV3, le conoscenze sulla sua epidemiologia e sul suo potenziale patogenetico sono ancora esigue, nonostante la sua circolazione sia stata attestata quantomeno in Cina e Stati Uniti e sia già stato associato a diverse manifestazioni cliniche tra cui disordini riproduttivi, miocarditi, infiammazioni multisistemiche, sindromi dermatite-nefrite e respiratorie (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016; Shen et al., 2017).

3.2. IL GENERE CIRCOVIRUS

Il genere *Circovirus*, interno alla famiglia *Circoviridae*, raggruppa virus privi di envelope, con un capsido a simmetria icosaedrica del diametro di approssimativamente 20 nm ed un genoma a ssDNA circolare di circa 2 kb (Rosario et al., 2017); si tratta del più piccolo genoma virale capace di replicazione autonoma (Todd et al., 2005). L'organizzazione del genoma è ambisenso e sono riconoscibili due *open reading frame* (ORF) principali (maggiori di 600 b), codificanti per una replicasi (*Rep*) e per un'unica proteina capsidica (*Cap*). Mentre *Rep* è molto conservata, *Cap* è significativamente divergente. Oltre a *Rep*, il complesso di replicazione include una più corta proteina *Rep'* originata per *splicing* alternativo (Rosario et al., 2017). A livello dell'origine di replicazione *Ori*, localizzata tra le estremità 5' dei due ORF maggiori, è presente una struttura a forcina (*stem-loop*) contenente un nonamero conservato la cui presenza sembra

essere necessaria per terminare la replicazione (Cheung, 2007; Delwart and Li, 2012), la quale avviene tramite *rolling circle replication* (RCR): il DNA monofilamento è dapprima convertito dagli enzimi cellulari in un intermedio superavvolto a doppio filamento a partire da un piccolo primer a RNA; successivamente il complesso di replicazione virale taglia il filamento positivo a livello del *loop*, la polimerasi cellulare sintetizza il filamento complementare a partire dall'estremità libera 3' ed al raggiungimento della struttura a forcina il complesso *Rep-Rep'* richiude covalentemente il filamento (Faurez et al., 2009). Analoghe strategie di replicazione mediante RCR sono riscontrabili nei virus appartenenti alle famiglie *Geminiviridae* e *Nanoviridae* e infettanti le piante (Faurez et al., 2009; Niagro et al., 1998). Evidenze filogenetiche supportano la teoria che il gene *rep* abbia avuto origine dalla ricombinazione tra un nanovirus (in seguito ad un salto di specie da piante a vertebrati) ed un virus *picorna-like* a ssRNA (Gibbs and Weiller, 1999).

I circovirus sono microorganismi ospite-specifici o con uno spettro d'ospite molto ristretto (Todd et al., 2005) e fino al 2010 ne era stata attestata l'infettività solo in ambito avicolo e nel suino; da allora ne sono stati identificati in diverse altre specie di mammiferi, tra cui cane, visone, pipistrello, uomo e scimpanzé (Rosario et al., 2017). Negli ultimi anni un gran numero di studi ha portato infatti a numerose aggiunte all'interno della famiglia *Circoviridae* (in primis alla creazione del nuovo genere *Cyclovirus*), rivelando un livello di diversità genetica inaspettatamente alto ed una storia evolutiva le cui origini potrebbero addirittura precedere la radiazione evolutiva degli eucarioti (Delwart and Li, 2012). Dato che sono già stati attestati salti di specie e l'esposizione umana a questi microorganismi è frequente, l'eventualità che nel prossimo futuro un circovirus o un cyclovirus possa divenire rilevante anche in medicina umana è considerata plausibile (Delwart and Li, 2012; Li et al., 2010).

3.3. PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 1 (PCV1)

PCV1 è stato scoperto nel 1974 come contaminante persistente di colture cellulari della linea PK-15 (Tischer et al., 1982, 1974). È un virus ubiquitario (Allan and Ellis, 2000; Beach et al., 2011), seppur con prevalenze molto basse (Calsamiglia et al., 2002; Puvanendiran et al., 2011), ed è storicamente considerato apatogeno in condizioni sia di

campo che sperimentali (Allan et al., 1995; Tischer et al., 1986). È stata tuttavia attestata la capacità di PCV1 di replicare e causare danni polmonari in feti inoculati al 55° giorno (Saha et al., 2011). Un confronto tra ceppi di PCV1 isolati a livello mondiale negli ultimi 25 anni ha evidenziato una scarsissima variabilità genetica, indicativa di un tasso evolutivo che risulta essere il più basso della famiglia *Circoviridae*; ciò è il risultato dell'alto grado di adattamento alla specie ospite, oltre che delle scarse pressioni selettive a cui PCV1 è sottoposto (Cortey and Segalés, 2012; Tombácz et al., 2014).

Per quanto considerato di nulla importanza clinica nel settore suinicolo (Puvanendiran et al., 2011), nel recente passato PCV1 ha attirato le attenzioni della comunità scientifica per via del suo ritrovamento come contaminante di alcuni vaccini vivi usati sia in veterinaria che in medicina umana (Baylis et al., 2011; Gilliland et al., 2012; Quintana et al., 2006; Victoria et al., 2010); ciò è probabilmente dovuto alla contaminazione delle linee cellulari o degli enzimi di origine suina utilizzati (Tombácz et al., 2014). La presenza di PCV1 nei vaccini non è comunque stata associata ad alcun rischio per la salute umana (Dubin et al., 2013; Han et al., 2017).

3.4. PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2)

Nel 1991 in Canada comparve una forma clinica che interessava animali di età tra le 8 e le 16 settimane ed era caratterizzata da deperimento, dispnea, linfadenomegalia, diarrea intermittente, pallore ed ittero; questa malattia venne descritta nel 1996 col nome di *Postweaning multisystemic wasting syndrome* (PMWS) e fu inizialmente associata a PCV1, allora noto semplicemente come PCV (Harding and Clark, 1997). Nel 1998 si scoprì che l'agente eziologico di PMWS era invece un nuovo circovirus distinto da PCV, il quale fu chiamato per l'appunto PCV2 (Meehan et al., 1998). Sebbene studi retrospettivi abbiano determinato come PCV2 fosse già presente quantomeno nel 1962 (Jacobsen et al., 2009) e ci siano evidenze di una sua circolazione endemica almeno per i 50 anni precedenti alla comparsa di PMWS (Grau-Roma et al., 2011; Segalés et al., 2013), è solo a cavallo tra gli anni '90 e la prima metà degli anni 2000 che questo virus si afferma come patogeno emergente a livello globale, causando epidemie su larga scala dapprima in Europa ed Asia e successivamente in America (Segalés et al., 2013); è stato inoltre associato a numerose manifestazioni cliniche diverse, indicate con la definizione

collettiva di *Porcine circovirus associated disease* (PCVAD o PCVD) (Segalés et al., 2013). A partire dalla loro commercializzazione su larga scala nel 2006, i vaccini contro PCV2 sono entrati tra le pratiche routinarie degli allevamenti di tutto il mondo, ottenendo notevoli risultati nel controllare quella che è tuttora considerata una delle principali minacce economiche e sanitarie per l'industria suinicola (Franzo et al., 2016b; Segalés, 2015).

PCV2 è il più piccolo virus conosciuto in grado di infettare i mammiferi (Meng, 2013). Nel suo genoma sono stati identificati 11 possibili ORF (Hamel et al., 1998): oltre a *Rep-Rep'* e *Cap*, codificate da ORF1 ed ORF2, sono note le due proteine originate da ORF3 ed ORF4 (situati nella stessa regione di ORF1 ma con orientamento opposto), le quali hanno rispettivamente proprietà apoptotica ed antiapoptotica (Lv et al., 2014).

La classificazione di PCV2 prevede cinque diversi genotipi: PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d e PCV2e. PCV2a, il primo ad essere scoperto, è stato il più diffuso per tutti gli anni '90 e fino al 2003, quando, in corrispondenza di un aumento di frequenza delle epidemie, è stato soppiantato da PCV2b (Carman et al., 2008; Cortey et al., 2011; Dupont et al., 2008; Grau-Roma et al., 2008; Wang et al., 2009). Evidenze successive mostrano come PCV2d, scoperto inizialmente in Cina ed ulteriormente classificabile in PCV2d-1 e PCV2d-2, stia diventando il nuovo genotipo predominante (Xiao et al., 2016, 2015). PCV2c è considerato di minore importanza, essendo stato rilevato solo in Danimarca in campioni d'archivio risalenti ad un periodo tra il 1980 ed il 1990 (Dupont et al., 2008), oltre che in popolazioni suine selvatiche del Brasile (Franzo et al., 2015). PCV2e è stato recentemente identificato in Nord America e presenta una divergenza marcata dai restanti genotipi, prevalentemente a livello di ORF2; è stato quindi ipotizzato che si tratti di un genotipo ancestrale rispetto a tutti quelli precedentemente noti (Davies et al., 2016). I ripetuti *shift* avvenuti tra i vari genotipi, i quali circolavano contemporaneamente da molto prima che PCVAD venisse scoperto, sembrano essere legati alla pressione selettiva indotta dall'immunizzazione naturale e dalla vaccinazione, oltre che al notevole tasso di mutazione di PCV2, comparabile con quello dei virus a RNA (Firth et al., 2009; Franzo et al., 2016a).

PCV2 è considerato un microrganismo ubiquitario, presente sostanzialmente in tutti gli allevamenti con prevalenze che si attestano mediamente sul 40-60%, con picchi del 100% (Baekbo et al., 2012; Firth et al., 2009). Solo il 5-30% degli animali infetti sviluppa i

sintomi di PCVAD (Meng, 2012), mentre i preponderanti individui subclinici manifestano un peggioramento dei parametri produttivi ed una maggior predisposizione alle infezioni secondarie (Alarcon et al., 2013; Segalés, 2012). È stato stimato che la maggior parte dei devastanti danni economici provocati da PCV2 sia imputabile per l'appunto alle infezioni subcliniche (Alarcon et al., 2013), le quali sembrano impattare negativamente anche sull'efficacia delle vaccinazioni contro *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) e *Classical swine fever virus* (CSFW) (Huang et al., 2011; Tanja Opriessnig et al., 2006b). Nonostante si tratti di un patogeno essenzialmente ospite-specifico, diverse evidenze supportano la possibilità che PCV2 abbia effettuato dei salti di specie: il virus è in grado infatti di replicare nei roditori (Lőrincz et al., 2010), oltre ad essere stato isolato in bovini con sindromi respiratorie, emorragiche o abortigene (in cui però l'esatto ruolo patogenetico di PCV2 non è stato accertato) (Kappe et al., 2010; Nayar et al., 1999), ed in campioni di carne bovina (Li et al., 2011); meno probabile è l'eventualità che PCV2 sia in grado di infettare l'uomo, dato che, a dispetto della frequente esposizione dovuta al consumo di carne suina contaminata, non sono mai stati rilevati anticorpi umani contro i circovirus suini (Li et al., 2010).

Le principali presentazioni cliniche riunite sotto l'acronimo di PCVAD sono: *PCV2-systemic disease* (PCV2-SD), *PCV2-reproductive disease* (PCV2-RD), *PCV2-enteric disease* (PCV2-ED), *PCV2-lung disease* (PCV2-LD) e *Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome* (PDNS) (Opriessnig et al., 2007; Segalés, 2012). L'età degli animali che manifestano PCVAD è solitamente compresa tra le 8 e le 16 settimane, eccezion fatta per PCV2-RD che colpisce ovviamente le scrofe in gestazione (Chae, 2005). Un singolo studio ha associato PCV2 ad una sindrome denominata *Acute pulmonary edema* (APE), caratterizzata da insorgenza iperacuta di stress respiratorio e da una mortalità del 20% e verosimilmente dovuta ad una tardiva vaccinazione di animali privi di anticorpi materni contro PCV2 (Cino-Ozuna et al., 2011). Diversi casi di linfadenite necrotizzante sono stati collegati all'infezione da parte di PCV2, per quanto l'esatto meccanismo patogenetico non sia stato chiarito (Chae, 2005; Galindo-Cardiel et al., 2011; Kim and Chae, 2005). PCV2 è inoltre riconosciuto come uno dei principali patogeni coinvolti nell'eziopatogenesi di *Porcine respiratory disease complex* (PRDC) (Chae, 2016; Hansen et al., 2010; Kim et al., 2003). I sintomi e le lesioni tipiche di ogni patologia sono riepilogati in **tabella 1**.

SINDROME	SEGN CLINICI	LESIONI MACROSCOPICHE	REPERTI MICROSCOPICI
PCV2-Systemic Disease (PCV2-SD) (nota anche come PMWS, Post-Weaning Multisystemic Syndrome)	Depperimento, anemia, ittero, linfadenopatia, pallore di cute e mucose, dispnea, diarrea	Linfoadenomegalia, foci biancastri sulla corticale renale, fegato atrofico e pallido, occasionali infarti splenici , polmoni con chiazze scure e non collassati, enterite catarrale con o senza edema mesenterico, ispessimento della mucosa enterica	Deplezione linfoctaria, linfoadenite granulomatosa, corpi inclusi citoplasmatici nei tessuti linfoidi, polmonite interstiziale da linfoistioctaria a granulomatosa, bronchiolite necrotizzante, nefrite interstiziale, enterite granulomatosa, epatite linfoistioctaria, infiltrazione linfoistioctaria in virtualmente qualsiasi tessuto
PCV2-Enteric Disease (PCV2-ED) (parzialmente sovrapponibile a PCV2-SD)	Diarrea, ridotto accrescimento medio giornaliero	Ispessimento della mucosa enterica, enterite catarrale con o senza edema mesenterico, ingrossamento dei linfo nodi mesenterici	Enterite granulomatosa, deplezione linfoctaria e linfoadenite granulomatosa limitate alle sole placche di Peyer
PCV2-Lung Disease (PCV2-LD) (nota anche come PNP, Proliferative and Necrotizing Pneumonia) (parzialmente sovrapponibile a PCV2-SD)	Dispnea	Polmoni con chiazze scure e non collassati	Polmonite broncointerstiziale granulomatosa con o senza bronchiolite necrotizzante e fibrosi bronchiolare, assenza di lesioni nei tessuti linfoidi
PCV2-Reproductive Disease (PCV2-RD)	Ritorni in estro irregolari, mumificazione fetale, aborti tardivi, natimortalità, riassorbimento embrionale	Feti mumificati o edematosi, congestione epatica fetale, epatomegalia fetale, ipertrofia cardiaca fetale con aree pallide multifocali, ascite fetale, idrotorace e idropericardio fetale	Miocardite fetale da non suppurativa a necrotizzante o fibrosante
Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS)	Nessuno	Irregolari papule e macule rosso scuro sulla cute (specialmente a livello di posteriori e perineo) con emorragie sottocutanee, cicatrici cutanee negli animali guariti, linfoadenomegalia, reni aumentati di volume, edema della pelvi renale, petecchie sulla corticale renale, occasionali infarti splenici	Vascolite necrotizzante sistemica, glomerulite fibrino-necrotizzante, nefrite interstiziale non purulenta, linfoadenite granulomatosa, deplezione linfoctaria
Acute Pulmonary Edema (APE)	Stress polmonare acuto, morte improvvisa	Fluido chiaro in cavità toracica, edema polmonare, aree di consolidamento cranioventrali, aree emorragiche dorsali	Edema con distensione dei setti intralobulari, infiltrazione macrofagica e linfoctaria diffusa, necrosi fibrinoidi delle pareti vascolari, deplezione linfoctaria
Linfadenite necrotizzante	Ridotto accrescimento medio giornaliero, diarrea, piresia, atassia	Linfadenite necrotizzante con linfo nodi uniformemente bianchi al taglio	Necrosi al centro dei follicoli linfoidi
PCV2-Subclinical Infection (PCV2-SI)	Ridotto accrescimento medio giornaliero	Nessuna	Deplezione linfoctaria, linfoadenite granulomatosa

Tabella 1 : Elenco delle varie sindromi raggruppate sotto la definizione di PCVAD e dei rispettivi segni clinici e lesioni (Chae et al., 2005; Cino-Orzua et al., 2011; Oppressung et al., 2007; Segalés, 2012).

La diagnosi delle varie forme di PCVAD richiede il reperimento da una parte dei relativi segni clinici e lesioni, dall'altra del DNA o degli antigeni di PCV2 nei tessuti interessati (Opriessnig et al., 2007; Segalés, 2012); le tecniche laboratoristiche solitamente usate sono IHC ed ISH, mentre la PCR è resa meno utile dall'ubiquità del virus e dalla difficoltà di differenziare le forme cliniche da quelle subcliniche (Segalés et al., 2012).

Il contatto diretto risulta essere la modalità di trasmissione più efficiente: la via d'infezione naturale è quella oronasale, per quanto il virus sia stato isolato in vari secreti oltre a quelli nasali, tra cui feci, urine, saliva, seme e latte (Grau-Roma et al., 2011; Rose et al., 2012). L'escrezione virale è di lunga durata, fino a 97 giorni post-svezzamento in condizioni di campo (Patterson et al., 2011). In uno studio sperimentale l'induzione di PMWS in animali naïve è stata ottenuta riproducendo la trasmissione aerea di PCV2 attraverso l'impianto di ventilazione (Kristensen et al., 2013). Possibile è anche la trasmissione indiretta tramite vettori animati (nello specifico roditori) e non (Lórinicz et al., 2010; Rose et al., 2012). La trasmissione verticale tramite viremia materna è stata dimostrata ed è associata a problematiche riproduttive e alla nascita di suinetti sia infetti sieropositivi sia persistentemente infetti (Rose et al., 2012; Shen et al., 2010). Mentre la trasmissione diretta tra singoli animali è considerata molto efficace, il passaggio di PCV2 da un allevamento ad un altro sembra legato unicamente all'introduzione di animali infetti, al coinvolgimento di vettori o all'utilizzo di seme infetto per l'inseminazione artificiale (Meng, 2012); d'altra parte, l'estrema stabilità ambientale del virus ne permette il mantenimento all'interno degli allevamenti per lunghi periodi, senza necessità di reintroduzione (Rose et al., 2012).

La patogenesi di PCV2 non risulta ancora pienamente compresa (Meng, 2013). Il virus ha come bersaglio i tessuti linfoidei, distrugge l'architettura follicolare e causa deplezione linfoide con sostituzione istiocitaria dei linfociti, linfopenia e conseguentemente immunosoppressione (Opriessnig et al., 2007). PCV2 è in grado di replicare nei monociti, nei macrofagi, nei linfociti, nelle cellule epiteliali ed endoteliali (Pérez-Martín et al., 2007; Yu et al., 2007), mentre l'internalizzazione da parte delle cellule dendritiche potrebbe avere un ruolo nella diffusione del patogeno e nell'evasione dalla risposta immunitaria (Vincent et al., 2003). Evidenze della replicazione virale si ritrovano nei linfonodi bronchiali e inguinali, nel timo, nelle tonsille, nei reni, nei polmoni, a livello

splenico ed epatico, oltre che a livello fetale nel caso di PCV2-RD (Ramamoorthy and Meng, 2009; Sanchez et al., 2003).

PCV2 è ritenuto agente causale essenziale ma non sufficiente per l'induzione di PCVAD (Segalés, 2015). Tra i diversi fattori coinvolti nella patogenesi ne sono stati riconosciuti alcuni relativi alle caratteristiche del virus e dell'ospite, altri legati alla presenza di coinfezioni, altri ancora legati allo stato immunitario degli animali colpiti (Opriessnig et al., 2007). È possibile che i diversi genotipi differiscano in virulenza, ma le evidenze attualmente disponibili sono contrastanti (Meng, 2013). Per quanto riguarda l'ospite, sebbene PCV2 sia in grado di infettare sia suini domestici che selvatici (Franzo et al., 2015) sono state dimostrate differenze nella predisposizione allo sviluppo di sintomatologia clinica tra diverse razze (Opriessnig et al., 2006a). Sia l'immunostimolazione, dovuta all'infezione da altri patogeni ma anche alla vaccinazione, che l'immunodepressione, inducibile ad esempio somministrando ciclosporine e cortisonici, hanno come risultato l'aumento dei titoli virali e della gravità della lesioni (Kawashima et al., 2003; Krakowka et al., 2002, 2001; Opriessnig et al., 2007; T Opriessnig et al., 2006). La coinfezione con patogeni secondari (inclusi PPV, PRRSV, PRV e *Mycoplasma hyopneumoniae*) è considerata un fattore importante per l'espressione di PCVAD, oltre ad aumentare i titoli di PCV2 rilevabili (Opriessnig and Halbur, 2012). La presenza di coinfezioni non è però strettamente necessaria per lo sviluppo della sintomatologia clinica, in quanto PCVAD è stata indotta sperimentalmente senza l'inoculo di altri patogeni oltre a PCV2 ma con l'esposizione a condizioni ambientali stressanti (Patterson et al., 2015). L'approccio adottato per il controllo di PCVAD prima dell'avvento dei vaccini (e tutt'ora valido) si focalizzava per l'appunto sui cofattori ambientali e infettivi, seguendo il cosiddetto "*Madec's 20 point plan*" (Madec et al., 2001; Segalés et al., 2005).

La vaccinazione rappresenta il metodo più efficace per il controllo di PCV2 ed in quanto tale è applicata dalla quasi totalità delle produzioni suinicole mondiali, tanto che in molti paesi pressoché tutti gli animali che arrivano al macello sono vaccinati. Oltre a prevenire lo sviluppo di PCV2-SD, PCV2-RD e PDNS, i vaccini sono estremamente utili nel controllare il calo delle performance tipico dell'infezione subclinica (Segalés, 2015). I prodotti disponibili in commercio, siano essi vaccini inattivati o a subunità, sono tutti basati su PCV2a (Li et al., 2016); ciononostante risultano protettivi anche nei confronti

di PCV2b e PCV2d (Beach and Meng, 2012; Opriessnig et al., 2017, 2014). I protocolli comunemente adottati prevedono la vaccinazione delle scrofe, dei suinetti o di entrambi i gruppi (Segalés, 2015). I suinetti vengono vaccinati a partire dalla terza settimana, sebbene un recente studio abbia evidenziato come anche la vaccinazione durante la prima settimana risulti efficace (Law et al., 2017). Tuttavia anche la vaccinazione di massa, se non applicata per periodi di tempo indeterminatamente lunghi, non sembra in grado di permettere l'eradicazione di PCV2 (Feng et al., 2014).

In conclusione, i notevoli risultati ottenuti grazie alla vaccinazione non significano che PCVAD sia una minaccia superata: esiste infatti la concreta possibilità che emergano nuove varianti non coperte dalla protezione vaccinale, anche e soprattutto per via della pressione selettiva esercitata vaccinando estensivamente contro un patogeno già di per sé ad evoluzione molto rapida (Franzo et al., 2016b; Segalés, 2015). Un monitoraggio epidemiologico continuo di PCV2 è quindi imprescindibile (Franzo et al., 2016b).

3.5. PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 (PCV3)

Una terza specie di circovirus del suino è stata recentemente identificata negli Stati Uniti (Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016) ed in Cina (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Shen et al., 2017).

Palinski et al. hanno rinvenuto PCV3 in feti mummificati abortiti da scrofe con segni clinici compatibili con PDNS, oltre che nelle scrofe stesse, andate incontro a morte acuta. Un'analisi metagenomica ha permesso il sequenziamento di un nuovo circovirus, denominato per l'appunto PCV3, la cui presenza nei tessuti di scrofe e feti è stata confermata con PCR e IHC; gli stessi tessuti sono invece risultati negativi per PCV2, PRRSV, *Porcine parvovirus* (PPV) e virus dell'influenza A (IAV). I due genomi di PCV3 interamente sequenziati sono stati nominati come ceppo 29160 (Genbank Acc. Number KT869077) e ceppo 2164 (Genbank Acc. Number KX458235). Uno studio retrospettivo condotto tramite PCR su altri campioni provenienti da animali con PDNS ma negativi per PCV2 ha evidenziato un'alta prevalenza (93,8%) di PCV3. Questi risultati sembrano suggerire da una parte che PCV3 abbia un ruolo nella patogenesi di PDNS e delle problematiche riproduttive, dall'altra che PCV3 circoli endemicamente negli Stati Uniti (Palinski et al., 2017).

Phan et al. hanno identificato PCV3 in tre suinetti affetti da miocardite ed infiammazione multisistemica, dopo aver attestato tramite PCR la negatività per PCV2, PRRSV, IAV, PPV, pestivirus, virus della West Nile, virus dell'encefalomiocardite, virus dell'afta, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyosinoviae* ed *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Dai campioni dei tre animali, provenienti da diverse situazioni produttive, sono stati sequenziati tre genomi non appartenenti a nessuna specie di circovirus conosciuta e con un'identità reciproca superiore al 98,95%; sono stati quindi nominati PCV3-US/MO2015 (Genbank Acc. Number KX778720), PCV3-US/MN2016 (GenBank Acc. Number KX898030) e PCV3-US/SD2016 (Genbank Acc. Number KX966193). Successive analisi per mezzo di ISH hanno attestato un'associazione anatomica tra la presenza di PCV3 e le lesioni cardiache. L'esatto ruolo patogenetico di PCV3 rimane però sconosciuto, anche alla luce del contemporaneo isolamento di astrovirus suini di tipo 4 (PAstV4) (Phan et al., 2016).

PCV3 è stato ritrovato nel sud della Cina in suinetti interessati da anoressia, piressia, acromodermia, respirazione addominale e mortalità sopra la media (Shen et al., 2017). I campioni di siero e di tessuti prelevati, testati tramite PCR secondo le specifiche indicate da Palinski et al., si sono rivelati positivi per PCV3; ulteriori esami hanno attestato la negatività per PCV2, PRRSV e virus della pseudorabbia. L'intero genoma di PCV3 è stato sequenziato e nominato come PCV3-China/GD2016 (Genbank Acc. Number KY418606). PCV3-China/GD2016 mostra rispettivamente il 98,5% ed il 97,4% di identità nucleotidica con PCV3 29160 e PCV3 2164 (Shen et al., 2017).

Un ulteriore genoma completo, denominato PCV3/CN/Hubei-618/2016 (Genbank Acc. Number KY354039), è stato sequenziato a seguito dell'isolamento di PCV3 in campioni prelevati in un allevamento cinese interessato da problematiche riproduttive (Fan et al., 2017).

Ku et al. hanno attestato l'endemicità di PCV3 sul territorio cinese. PCV3 è stato dapprima rilevato come unico patogeno in tre allevamenti in cui si registravano aumenti dei tassi di natimortalità e di mortalità delle scrofe stesse; l'indagine è stata poi estesa ad un totale di 35 allevamenti distribuiti in 11 province cinesi: PCV3 è stato rilevato in tutte le province, nel 69% degli allevamenti e nel 35% dei campioni prelevati. Spesso nello stesso allevamento PCV2 e PCV3 circolavano contemporaneamente e nel 16% dei

campioni erano presenti in coinfezione. Sono stati sequenziati nove genomi completi, la cui identità con PCV3-US/MO2015 è superiore al 99% (Ku et al., 2017).

Non è ancora chiaro se PCV3 si sia evoluto nei suini senza mai essere rilevato fino ad ora, se abbia avuto origine dalla ricombinazione tra circovirus sconosciuti o se sia il risultato di un passaggio di specie (Palinski et al., 2017). Il genoma conosciuto più simile a quello di PCV3 appartiene ad un circovirus (Genbank Acc. Number KJ641723) circolante nella popolazione cinese di pipistrelli ferri di cavallo (*Rhinolophus sinicus*): ciò sembra suggerire che proprio i pipistrelli possano essere l'origine di PCV3 (Phan et al., 2016).

Il genoma di PCV3, della lunghezza di 2 kb, presenta al suo interno diversi ORF di lunghezza superiore a 200 b: oltre alle due ORF di senso opposto codificanti per *Rep* e *Cap* caratteristici di tutti i circovirus, ne è stato identificato un terzo codificante per una proteina dalla funzione sconosciuta. Il nonamero contenuto nella struttura a forcina è identico a quello presentato da PCV1 (Palinski et al., 2017). La replicasi di PCV3 presenta un'identità superiore al 95% rispetto a quelle di due genomi solo parzialmente sequenziati di circovirus, PorkNW2/USA/2009 (Genbank Acc. Number HQ738638) e SFBeef (Genbank Acc. Number KM111537); il fatto che quest'ultimo sia stato isolato in un bovino indica una possibile estensione del tropismo ad altre specie di ungulati (Phan et al., 2016). Le proteine capsidiche di PCV2 e PCV3 presentano un'identità del 30% circa, per cui l'eventualità di una efficace cross-protezione sembra improbabile. Inoltre la proteina originata da ORF3 è per il 94% identica a quella codificata da un ORF rilevato nella sequenza parziale di PorkNW2/USA/2009 (Palinski et al., 2017).

PCV3 è stato rilevato con diverse tecniche diagnostiche (PCR, ISH, IHC, ELISA) in campioni di vario genere, tra cui cervello, polmoni, tessuti fetali, linfonodi, reni, cute, tonsille, siero e seme (Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017). In particolare, il rinvenimento del virus nel seme e nei feti sembra suggerire la possibilità di una trasmissione verticale (Ku et al., 2017).

Future ricerche su PCV3 saranno sicuramente necessarie per accertarne il plausibile ruolo eziopatogenetico (da solo o in coinfezione) in diverse manifestazioni cliniche, nonché dal rischio che possa ripercorrere la stessa storia epidemiologica di PCV2 (Palinski et al., 2017).

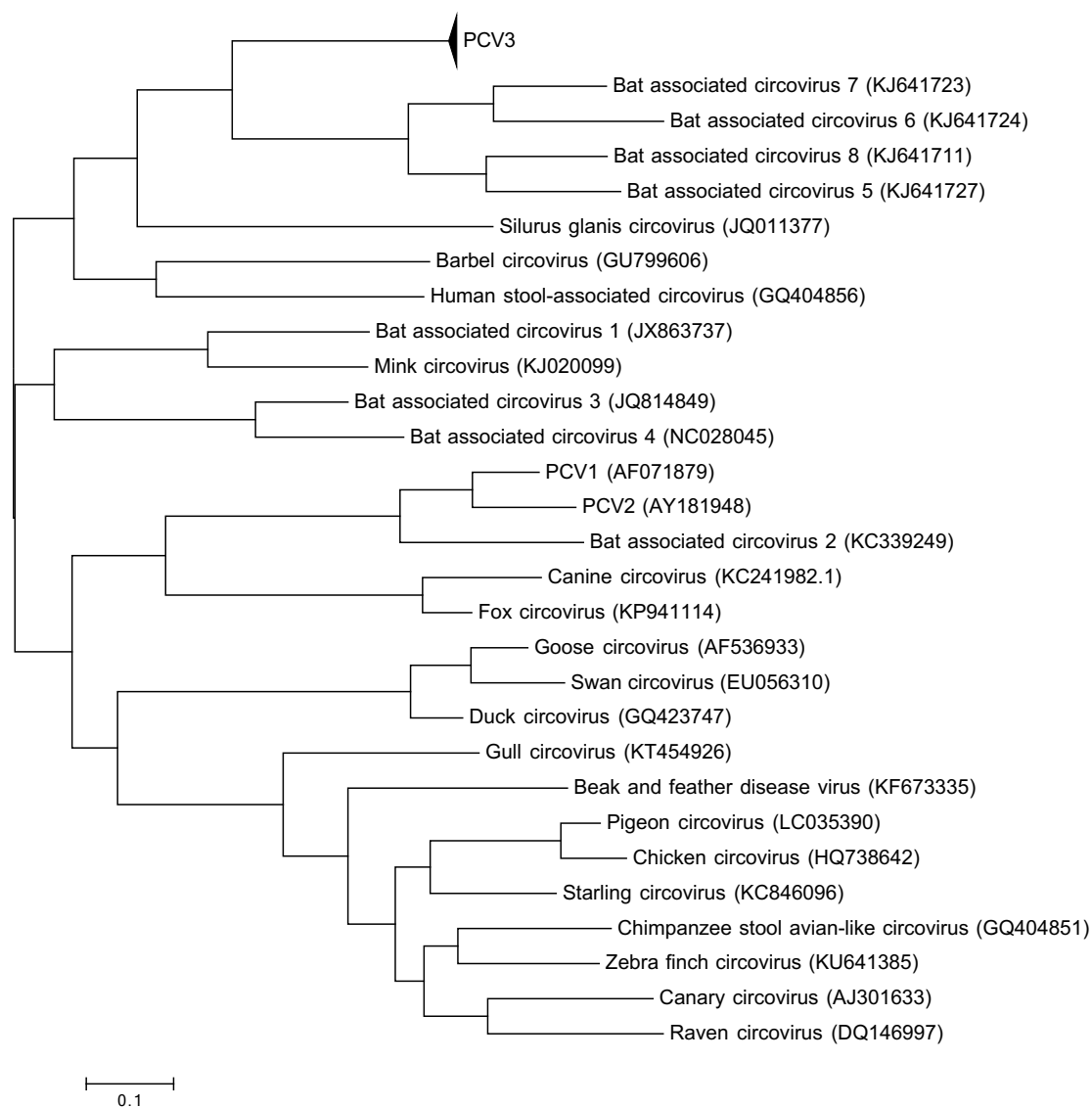


Figura 1. Albero filogenetico del genere *Circovirus*, costruito applicando l'approccio di *Maximum Likelihood*, basato sul modello Tamura-Nei ed implementato nel software MEGA7 (Kumar et al., 2016). L'allineamento di partenza è stato ottenuto utilizzando il programma MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/#ref>)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

4. MATERIALI E METODI

4.1. CAMPIONI

La ricerca di *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Porcine circovirus type 3* (PCV3) è stata condotta su un totale di 120 campioni precedentemente risultati positivi per altri patogeni (respiratori e non) durante la routinaria attività diagnostica condotta da un'importante filiera produttiva del Nord Italia all'interno dei suoi allevamenti suini. I campioni risultavano prelevati tra il 2014 ed il 2017 tra Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Piemonte e Friuli-Venezia Giulia (fig. 2). Successivamente sono stati conservati a -80 °C. Tra i tipi di matrice riscontrati si annoverano: tessuto polmonare, linfonodale, placentare e fetale (in caso di episodi di aborto), *pool* di diversi organi, sangue, scoli orali, tamponi nasali, raschiati orofaringei e spugnette (utilizzate per il campionamento delle superfici degli automezzi per il trasporto animali).

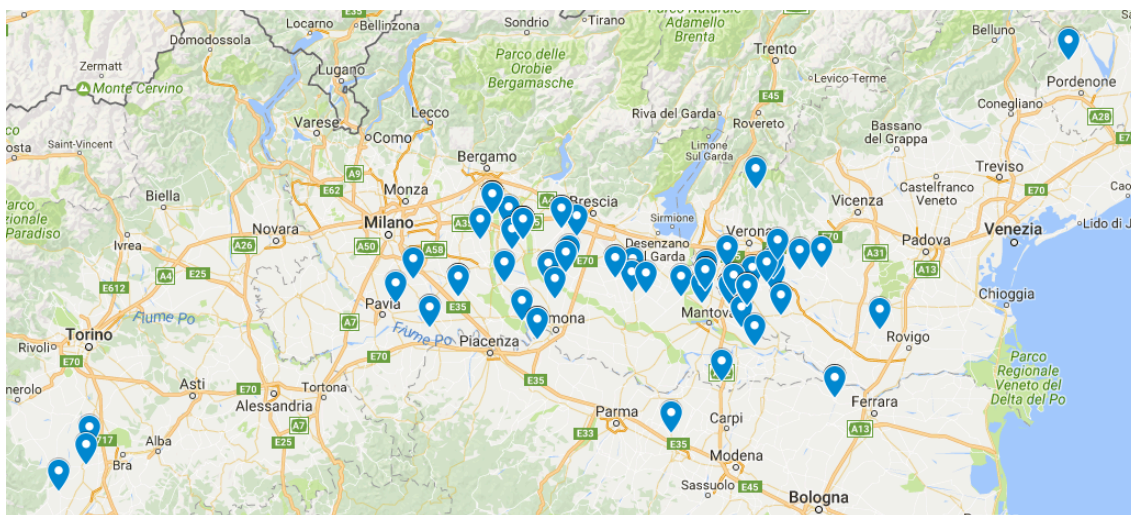


Figura 2. Distribuzione geografica degli allevamenti in cui sono stati prelevati i campioni.

4.2. DATABASE

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

- Identificativo del campione;
- Anno di raccolta;
- Identificativo della scatola per lo stoccaggio dei campioni;
- Identificativo della scatola per lo stoccaggio degli estratti;

- Risultato della PCR per la ricerca di Mhyo;
- Risultato della PCR per la ricerca di PCV3;
- Tipo di matrice del campione;
- Allevamento in cui è stato prelevato il campione;
- Comune dell'allevamento;
- Categoria produttiva dell'animale;
- Età dell'animale;
- Motivo del prelievo, se previsto all'interno di un piano di controllo routinario o effettuata sulla base di un sospetto clinico; nel secondo caso la sintomatologia è stata classificata in respiratoria, riproduttiva e sistemica (mortalità compresa);
- Presenza o meno di reperti necroscopici e loro categorizzazione in lesioni solo broncopolmonari o sia broncopolmonari che localizzate in altre sedi;
- Esiti degli esami per la ricerca di *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Porcine circovirus type 2* (PCV2) (se disponibili);
- Quantificazione del titolo virale di PCV2, espressa in “Positività alta, media, bassa”;
- Esiti degli esami per la ricerca di *Swine influenza virus* (SIV) (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Streptococcus suis* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Mycoplasma hyorhinis* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Corinebacterium pyogenes* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Porcine epidemic diarrhoea virus* (PEDV) (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Bordetella bronchiseptica* (se disponibili);

4.3. DISEGNO DEI PRIMER

Diverse coppie di *primer* sono state disegnate utilizzando il programma *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), per poi selezionare

quelle più performanti attraverso prove sperimentali. La specificità degli oligonucleotidi è stata valutata mediante *Primerblast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), mentre l'impiego del software *OligoAnalyzer 3.1* (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) ha permesso di accertare che la complementarietà fra i *primer* fosse bassa, scongiurando così l'insorgere di problemi legati alla struttura secondaria come la formazione di *hairpin*, omo- ed eterodimeri. Particolare attenzione è stata posta alla posizione di *annealing* dei primer di PCV3, per fare in modo che corrispondesse alla regione codificante per *Rep*.

I dati relativi ai *primer* sono elencati in **tabella 2**.

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

Tabella 2. *Primer* utilizzati per l'amplificazione di Mhyo e PCV3.

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

4.4. PROTOCOLLO PCR

Per l'amplificazione è stato utilizzato il kit *Phire™ Animal Tissue Direct PCR* (Thermo Scientific), il quale può essere impiegato seguendo due diversi protocolli, uno diretto prevedente la sola reazione di PCR ed uno in cui prima della PCR il campione viene diluito e sottoposto ad una preprocessazione atta a liberare il DNA dal tessuto. Sebbene la seconda soluzione vada a limitare i vantaggi garantiti dalla *direct PCR* in termini di tempo necessario per svolgere le analisi, si è scelto quest'ultimo approccio (seppur con qualche modifica rispetto alle istruzioni fornite dalla ditta produttrice) in quanto consigliato nel caso si abbia a che fare con *primer* e tipi di campioni non precedentemente testati, come per l'appunto in questo studio. Le aliquote preprocessate sono state stoccate a -20 °C.

Oltre ai campioni, in ogni reazione sono stati inclusi un controllo negativo e due controlli positivi, uno per PCV3 e uno per Mhyo. Il controllo positivo di Mhyo è stato gentilmente fornito dal dottor Salvatore Catania dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, mentre per quanto riguarda PCV3, non essendo disponibili isolati di questo virus, si è proceduto alla sintesi di un plasmide sintetico contenente il genoma completo di PCV3, la cui sequenza ci è stata gentilmente concessa dal prof. Hause della Kansas State University. Nel dettaglio, la sequenza completa di PCV3 è stata fatta sintetizzare chimicamente e clonare in un plasmide vettore (pUC57-Kan Vector) da una ditta specializzata (GenScript). Con il costrutto così ottenuto sono stati trasformati degli *E.coli* Top10 competenti (Invitrogen). Al fine di ottenere un controllo che emulasse la presenza del virus all'interno delle cellule dei tessuti animali, una sospensione contenente 10^5 E. coli/mL è stata ulteriormente diluita 1:100 in una matrice ottenuta dall'omogeneizzazione di polmone suino in PBS.

La fase di effettiva analisi dei campioni è stata preceduta dalla validazione dei protocolli da utilizzare. Dopo aver testato numerosi settaggi differenti a livello termico e di concentrazione di reagenti e campioni (Fig. 3), sono stati definiti due protocolli distinti per PCV3 e Mhyo capaci di garantire prestazioni ottimali, illustrati dettagliatamente nella sezione relativa ai risultati.

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

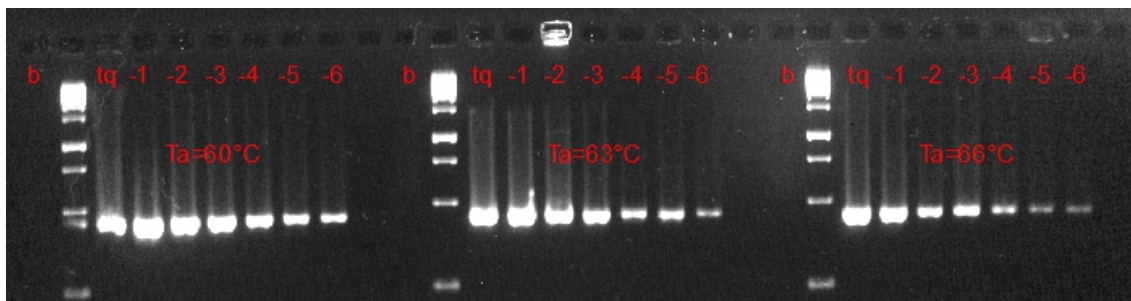


Figura 3. Una delle prime fasi della validazione del protocollo relativo a Mhyo, in cui sono stati confrontati i risultati di PCR condotte con diverse temperature di *annealing*.

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

4.5. ELETTROFORESI SU GEL

I prodotti della PCR, dopo l'aggiunta di un addensante *6X DNA Loading Dye*[®] (Thermo Scientific), sono stati caricati su gel di agarosio 2% addizionato con *EuroSafe Nucleic Acid Staining Solution*[®] (EuroClone S.p.A.). Per rendere possibile la valutazione dei risultati è stata caricata anche *GeneRuler 100bp DNA Ladder*[®] (Thermo Scientific), una miscela di frammenti di DNA di peso molecolare e concentrazione noti. La corsa elettroforetica è stata ottenuta impostando la tensione a 100V ed il tempo a 30 minuti. Il gel è quindi stato analizzato con un transilluminatore *Gel Doc XR System*[®] (Bio-Rad) e visualizzato con *Image Lab*[™] *Software* (Bio-Rad).

4.6. ANALISI STATISTICA

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

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1. VALIDAZIONE DEL PROTOCOLLO

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

Una prima parte, comune ai due protocolli, prevede l'aggiunta di 20 µl di *Dilution Buffer* e 0,5 µl di *DNARelease Additive* a 2 µl di ciascun campione, la centrifugazione e l'incubazione per 5 minuti a 25 °C e per i successivi 4 minuti a 98 °C. Dalla soluzione preprocessata si prelevano quindi 2 µl, a cui va addizionato un mix di reazione composto da *Phire Animal Tissue PCR Buffer 1x*, una concentrazione finale di 0,6 µM di ciascun *primer*, 0,42 µl di *Phire Hot Start II DNA Polymerase* e acqua da biologia molecolare fino ad un volume finale di 20 µl.

A questo punto i protocolli termici differiscono, come illustrato in **tabella 3**.

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

Tabella 3. Protocolli di PCR utilizzati per Mhyo e PCV3.

I protocolli così validati hanno evidenziato una sensibilità analitica pari a 6,24 copie/µl per PCV3 e 4,67 ucc/µl nel caso di Mhyo, del tutto comparabile a quella dimostrata dalle metodiche tradizionali.

Sebbene durante il processo di validazione non si siano ravvisati problemi, all'effettiva applicazione del protocollo relativo a Mhyo è stata riscontrata la sporadica presenza di bande aspecifiche; essendo però queste ultime facilmente distinguibili dagli amplificati desiderati, si è scelto di non modificare ulteriormente il protocollo, in quanto la ricerca di una maggior specificità avrebbe potuto impattare negativamente sulla sensibilità.

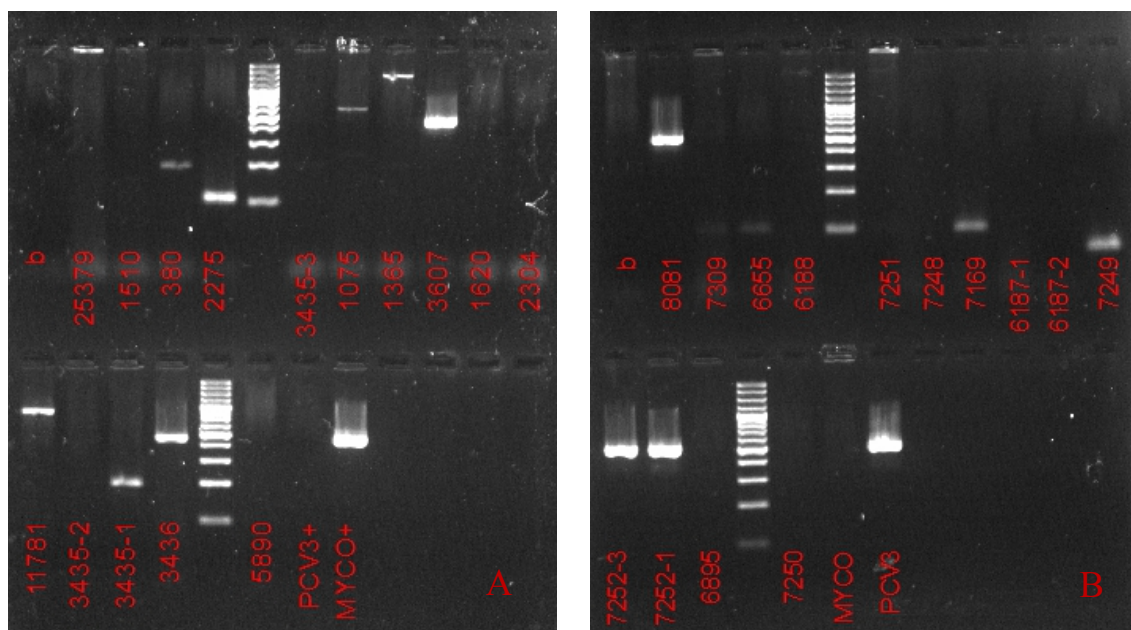


Figura 4 (a-b). Risultati della ricerca in alcuni campioni di Mhyo (a) e PCV3 (b). Nel primo caso si ravvisa la presenza di alcune bande aspecifiche, nel secondo no.

Il confronto dei protocolli validati con metodiche molecolari tradizionali ha permesso di attestarne le buone prestazioni in termini di sensibilità analitica. La specificità è stata invece indirettamente confermata dal fatto che molti dei campioni analizzati, pur essendo positivi nei confronti di altri microrganismi con genomi a DNA (tra cui *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Porcine circovirus type 2* e verosimilmente anche *Porcine circovirus type 1*), non sono risultati positivi per Mhyo e PCV3. In una decina di campioni era inoltre già stata effettuata la ricerca di Mhyo, con risultati rivelatisi analoghi. Ad ulteriore conferma della specificità dei protocolli, il sequenziamento di due campioni trovati positivi (rispettivamente 3436 per Mhyo e 32941 per PCV3) ha dimostrato l'effettiva presenza dei microrganismi ricercati. La ripetibilità è stata valutata sottoponendo una ventina di campioni a ripetute prove, le quali hanno prodotto esiti concordanti.

5.2. INDAGINI SU CAMPIONI SPERIMENTALI E ANALISI STATISTICA

Tra i 120 campioni analizzati, 36 sono risultati positivi per PCV3 e 21 per Mhyo. Gli esiti delle analisi di PCR sono stati messi in relazione con vari dati disponibili in merito agli

animali campionati (la categoria produttiva, l'allevamento di appartenenza, la sintomatologia ed i referti necroscopici), alle circostanze del prelievo dei campioni (il tipo di matrice, il motivo del prelievo) e ai risultati di indagini diagnostiche già svolte.

5.2.1. DISTRIBUZIONE

I campioni provenivano da 55 diversi allevamenti appartenenti a diverse fasi di una filiera multisito. In 16 di questi è stato ritrovato Mhyo (fig. 5a), mentre quelli interessati dalla presenza di PCV3 si sono rivelati 26 (fig. 5b).



Figura 5 (a-b). Distribuzione geografica relativa a Mhyo (a) e PCV3 (b).

Da sottolineare è l'assoluta rilevanza dei dati relativi a PCV3. Si tratta infatti della prima identificazione di questo virus al di fuori di Cina e Stati Uniti. La presenza sul territorio italiano, alla luce della marcata globalizzazione caratterizzante il settore suinicolo, non

deve stupire. Le positività riscontrate non sono peraltro limitate ad un rinvenimento sporadico, ma evidenziano come PCV3 sia ampiamente diffuso nonostante la recentissima scoperta. Sebbene non sia possibile inferire sulla prevalenza per via della natura del campionamento, PCV3 è stato ritrovato nel 30% dei campioni: un dato sorprendente, il quale non fa che corroborare l'ipotesi che questo microrganismo sia epidemiologicamente affine a PCV2, patogeno ubiquitario e nella maggior parte dei casi non associato a sintomatologia clinica.

La distribuzione di Mhyo conferma come si tratti di un patogeno comunemente circolante. L'utilizzo di matrici non considerate ideali per la ricerca di questo batterio, di cui verrà discusso nella sezione dedicata, fa però pensare che le positività attestate siano in realtà sottostimate.

5.2.2. MATRICI

Ai fini di una efficace applicazione di metodiche basate su PCR, il tipo di materiale biologico da cui viene estratto il materiale genetico risulta determinante per due principali ragioni: da una parte taluni patogeni sono caratterizzati da un tropismo per tessuti specifici e non risultano rilevabili in altri, dall'altra la natura della matrice può interferire in varia misura sulle prestazioni analitiche dei protocolli usati.

Il 90% dei campioni analizzati erano costituiti da uno tra sangue, polmone, *pool* di vari tessuti e fluido orale, per cui si è deciso di comparare i risultati ottenuti a partire da queste matrici senza includere le rimanenti in quanto scarsamente rappresentate. Il materiale biologico dei campioni è stato inoltre messo in relazione con le ragioni per cui sono stati prelevati (per autocontrollo o in presenza di sintomatologia) così da evidenziare eventuali associazioni statisticamente significative: come preventivabile, si è dimostrato come nei casi caratterizzati da sintomatologia respiratoria il sito del prelievo fosse più frequentemente polmonare (fig. 6). Ciò impone di valutare con attenzione questa fattispecie, in quanto l'effetto della matrice sulle positività risulta difficilmente scindibile da quello della sintomatologia (e viceversa).

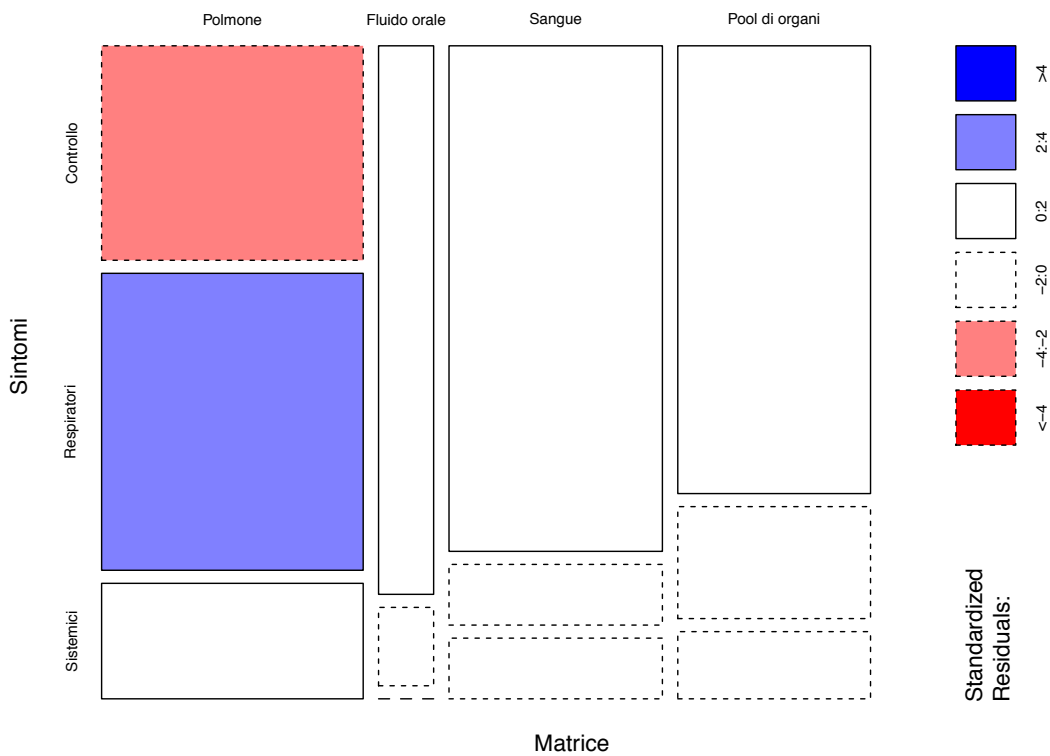


Figura 6. *Mosaic plot* che illustra le frequenze delle matrici campionate in funzione della sintomatologia riscontrata. I residui standardizzati, codificati per colore e tipologia di contorno, definiscono la deviazione dei dati osservati rispetto alle attese: quando maggiori di 2, essi attestano una differenza statisticamente significativa ($p\ value < 0,05$).

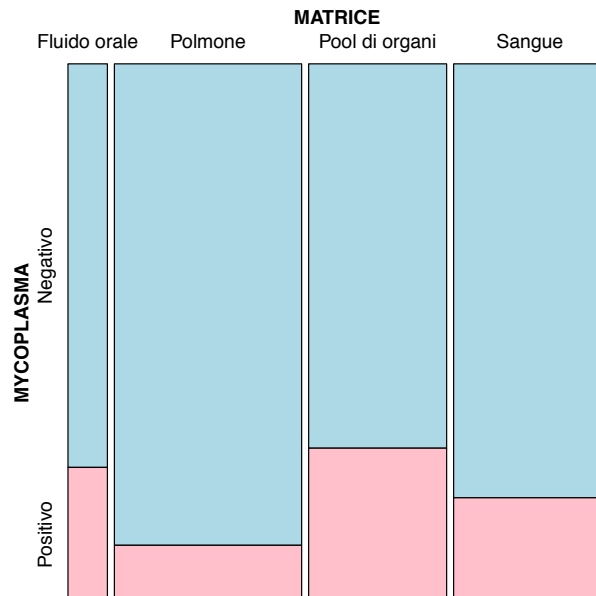


Figura 7. *Mosaic plot* che mette in relazione gli esiti della ricerca di Mhyo con il tipo di matrice dei campioni.

Le differenze tra le positività per Mhyo riscontrate nelle diverse matrici (fig. 7) non si sono rivelate statisticamente significative. Il numero di positivi attestati a partire da tessuti polmonari era però in difetto rispetto alle frequenze attese: ciò può trovare spiegazione nel fatto che il polmone non rappresenta il sito d'elezione da campionare per la ricerca di Mhyo, non garantendo la stessa sensibilità che si avrebbe usando lavaggi broncoalveolari o tamponi tracheali (Fablet et al., 2010; Kurth et al., 2002). Poco idonei alla ricerca di questo microrganismo vanno considerati anche sangue, *pool* di organi e fluidi orali: è quindi ipotizzabile che le positività riscontrate siano fortemente sottostimate.

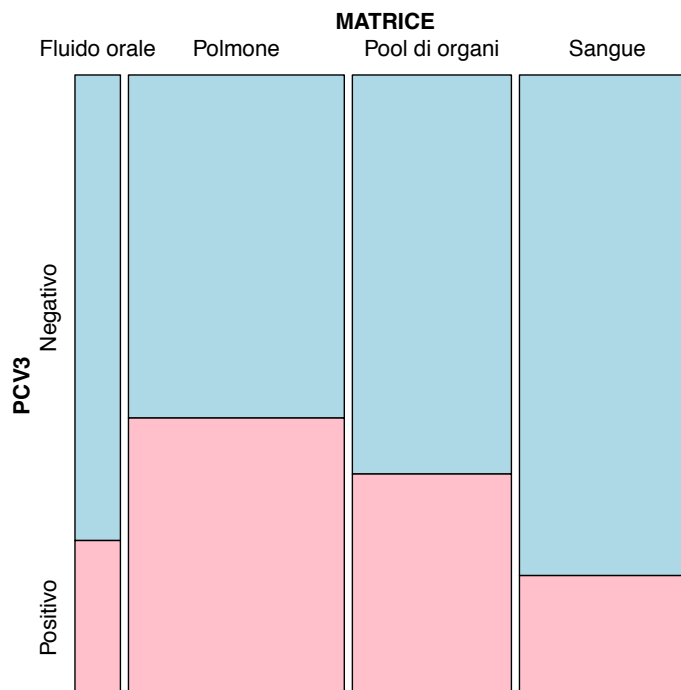


Figura 8. Mosaic plot che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 con il tipo di matrice dei campioni.

Nemmeno per ciò che concerne PCV3 le differenze tra gli esiti relativi alle diverse matrici risultano statisticamente significative, per quanto sia possibile osservare un eccesso di positivi rispetto alle frequenze attese relativamente al tessuto polmonare (fig. 8). Mentre il rilevamento di PCV3 tramite PCR a partire da siero, polmone ed altri organi è già stato riportato (Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017), la possibilità di amplificarne il DNA a partire dai fluidi oronasali rappresenta un dato inedito.

Per quanto riguarda gli altri tipi di materiale biologico, un tampone nasale si è rivelato positivo per PCV3: anche in questo caso si tratta di una matrice mai testata prima per

questo microrganismo. Tutte le spugnette, i tessuti placentari e i raschiati orofaringei sono invece risultati negativi per entrambi i microrganismi.

Da notare inoltre come le PCR condotte a partire da campioni di materiale fetale o sangue materno collegati ad episodi di aborto non abbiano evidenziato in nessuno dei 7 casi la presenza di PCV3, il cui rinvenimento in queste matrici è già stato descritto (Palinski et al., 2017). Al contrario, uno dei feti è risultato positivo per Mhyo, per il quale non è riferita la trasmissione intrauterina (Bürgi et al., 1990): visto l'ingente *shedding* di Mhyo attraverso i secreti oronasali delle madri, ciò è probabilmente da attribuirsi ad una contaminazione ambientale ad aborto avvenuto.

5.2.3. CATEGORIE PRODUTTIVE

I campioni analizzati provenivano da suini appartenenti a diverse categorie produttive, riflettendo quindi situazioni epidemiologiche differenti non solo per l'età degli animali ma anche per la fase della filiera interessata.

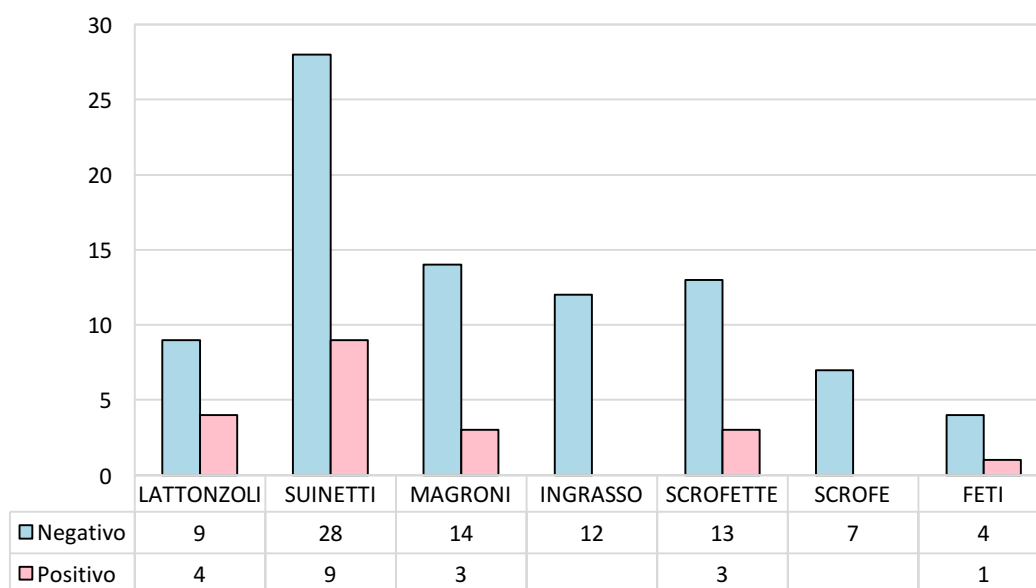


Figura 9. Conteggio degli esiti degli esami per la ricerca di Mhyo divisi per categoria produttiva degli animali da cui sono stati prelevati i campioni.

La tipica forma endemica della micoplasmosi è sostenuta dalla trasmissione verticale diretta a livello di scrofaia, con i suinetti infetti che sono responsabili di un lento *spread* che coinvolge dapprima i compagni di nidiata e poi quelli di box (Thacker and Minion,

2012). I dati ottenuti (fig. 9) mostrano un *pattern* di questo tipo, con una decrescita progressiva delle positività dal 31% rilevato tra i lattonzoli (1°-4° settimana), al 24% tra i suinetti (5°-8° settimana), al 17,65% tra i magroni (9°-12° settimana), fino allo 0% attestato in fase di ingrasso.

Per quanto riguarda le scrofe, è stato riportato un rapporto di proporzionalità inversa tra il numero di parti e la prevalenza di Mhyo, con le scrofette che presentano tassi di infezione più alti (Calsamiglia and Pijoan, 2000). Ciò è in accordo con i dati raccolti in questo studio, per quanto numericamente esigui (anche considerando che alcuni campioni sono stati prelevati da scrofe interessate di problematiche riproduttive, non associabili alla presenza di Mhyo).

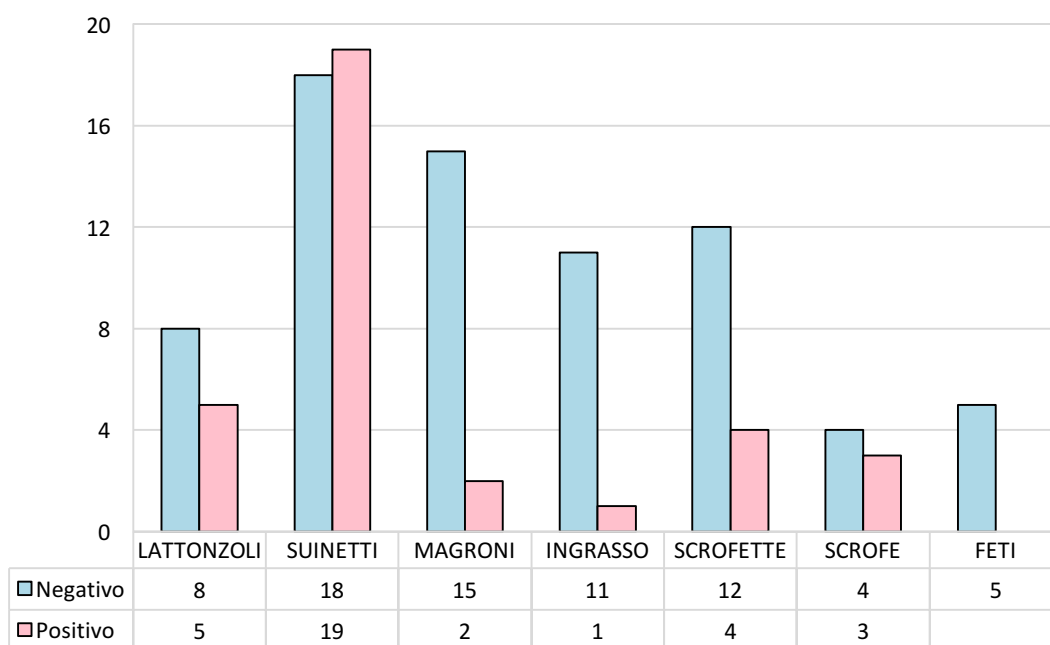


Figura 10. Conteggio degli esiti degli esami per la ricerca di PCV3 divisi per la categoria produttiva degli animali da cui sono stati prelevati i campioni.

La distribuzione di PCV3 nelle diverse fasce d'età e nei diversi siti produttivi non è stata trattata negli studi svolti finora su questo microrganismo. I dati raccolti nell'ambito di questo progetto (fig. 10) mostrano un picco statisticamente significativo (con un 51% di positività) in corrispondenza del periodo tra la quinta e l'ottava settimana di vita: ciò è probabilmente collegato al rimescolamento e allo stress a cui vanno incontro i suinetti al momento dello svezzamento, un momento particolarmente critico dal punto di vista in termini di pressione infettante e di capacità di risposta dell'animale. La progressiva decrescita

dell'incidenza fino all'8% riscontrato in fase di ingrasso rende plausibile ipotizzare che gli animali acquisiscano un'immunità in grado di contrastare efficacemente l'infezione; non è inoltre da escludere che l'organizzazione tipicamente multisito della filiera da cui provenivano i campioni contribuisca a combattere la trasmissione orizzontale. Il fatto che sia nelle scrofe sia nei lattonzoli si sia rinvenuto PCV3 porta a speculare sulla possibilità di una qualche forma di trasmissione verticale, sebbene il mancato rilevamento del virus in tessuti fetali non permetta di stabilire se questa trasmissione avvenga a livello intrauterino, o se invece interessi il periparto. Le informazioni raccolte delineano un quadro epidemiologico che ancora una volta presenta punti di contatto con PCV2.

5.2.4. COINFEZIONI

Mhyo è stato ritrovato in coinfezione con PCV3, *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV), *Porcine circovirus type 2* (PCV2), *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyorhinis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (fig. 11). Tutti questi microrganismi (con l'ovvia eccezione di PCV3) sono ampiamente descritti come patogeni secondari la cui infezione è favorita dall'azione immunodepressiva di Mhyo (Thacker and Minion, 2012). Nessuno dei campioni positivi per Mhyo era stato sottoposto alla ricerca di *Corinebacterium pyogenes*, *Porcine epidemic diarrhoea virus* (PEDV) e *Bordetella bronchiseptica*.

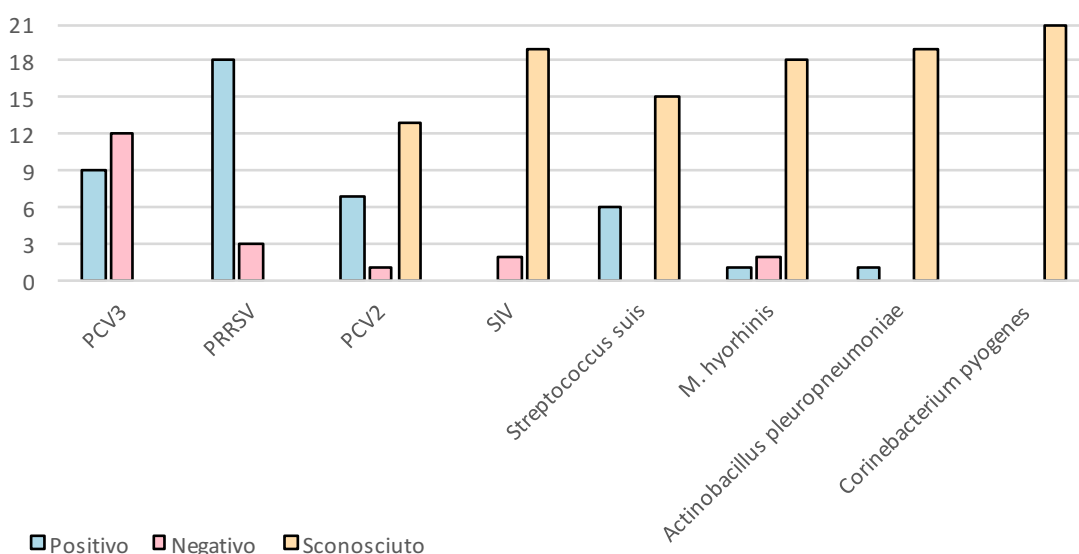


Figura 11. Conteggio degli esiti diagnostici relativi ad altri patogeni nei campioni risultati positivi alla ricerca di Mhyo.

PCV3 è stato ritrovato in coinfezione con Mhyo, PRRSV, PCV2, *Swine influenza virus* (SIV), *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Corinebacterium pyogenes* (fig. 12). In nessuno dei campioni positivi per PCV3 erano stati ricercati PEDV e *Bordetella bronchiseptica*.

Attualmente non è disponibile alcun dato inerente alle interazioni con altri patogeni, quindi tutte le informazioni relative alle coinfezioni sono inedite.

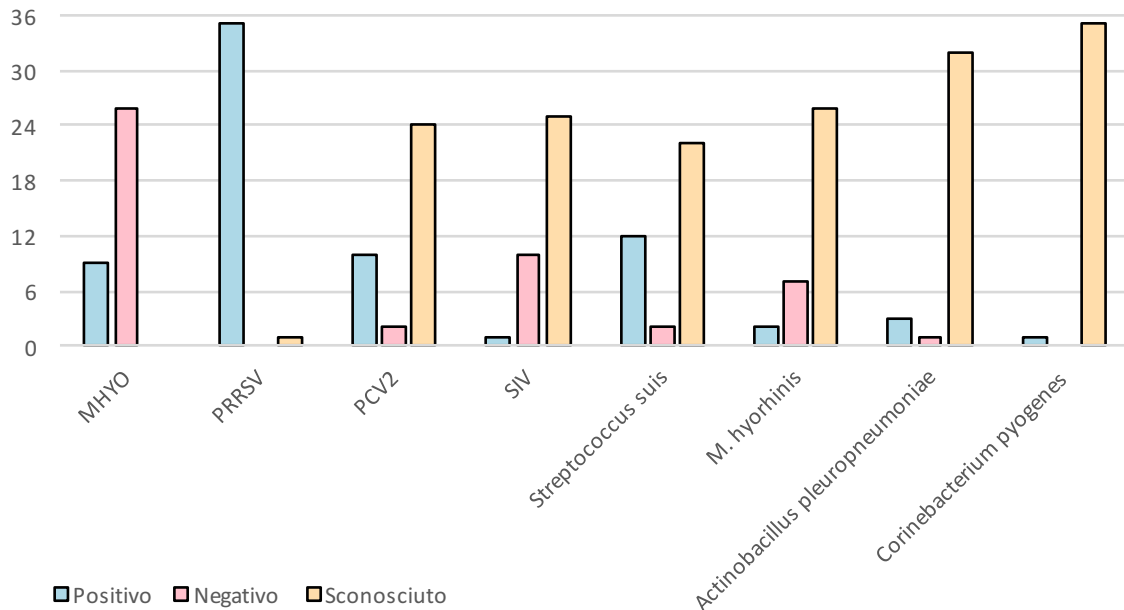


Figura 12. Conteggio degli esiti diagnostici relativi ad altri patogeni nei campioni risultati positivi alla ricerca di PCV3.

La natura del campionamento si è rivelata un ostacolo nell’elaborazione dei dati relativi alle coinfezioni. Tutti i campioni erano infatti positivi almeno a uno tra PRRSV e PCV2, e l’intensità con cui i vari patogeni erano stati ricercati risultava estremamente variabile. Nella maggior parte dei casi ci si è quindi dovuti limitare a statistiche puramente descrittive.

La coinfezione tra Mhyo e PCV3 interessava nove campioni. PCV3 è stato rinvenuto più frequentemente rispetto alle attese nei campioni positivi per Mhyo, per quanto non si tratti di una differenza statisticamente significativa (fig. 13). Ulteriori studi saranno necessari per accertare l’esistenza di una qualche interazione tra i due patogeni.

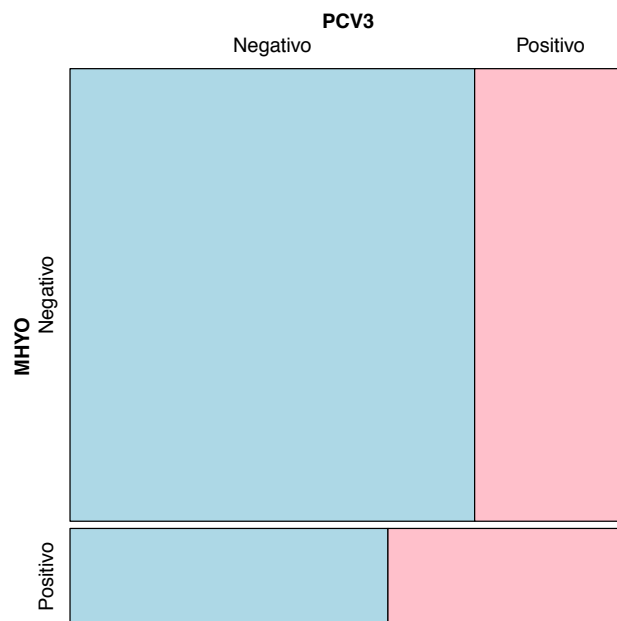


Figura 13. *Mosaic plot* che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 con quelli relativi a Mhyo.

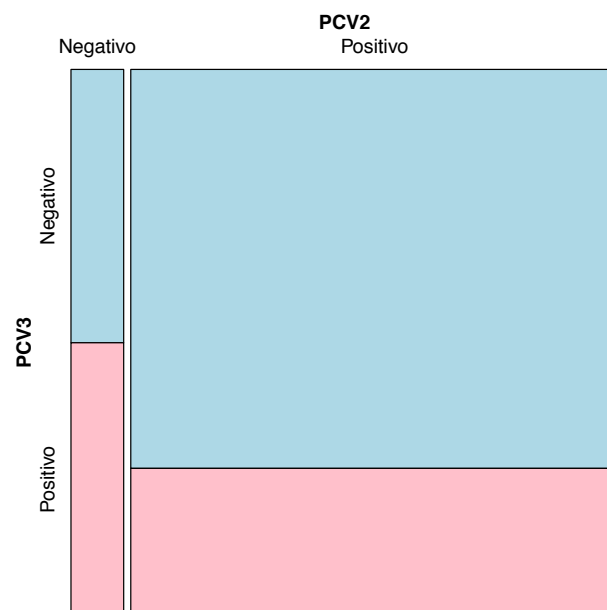


Figura 14. *Mosaic plot* che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 con quelli relativi a PCV2.

In dieci campioni si è attestata la coinfezione tra PCV3 e PCV2. Il ritrovamento di PCV3 è stato più frequente rispetto alle attese in campioni negativi per PCV2, ma ancora una volta si tratta di una differenza non statisticamente significativa (fig. 14). Per quanto suggestiva, l'eventualità che esista una competizione di qualche tipo tra PCV3 e PCV2 è ancora tutta da provare.

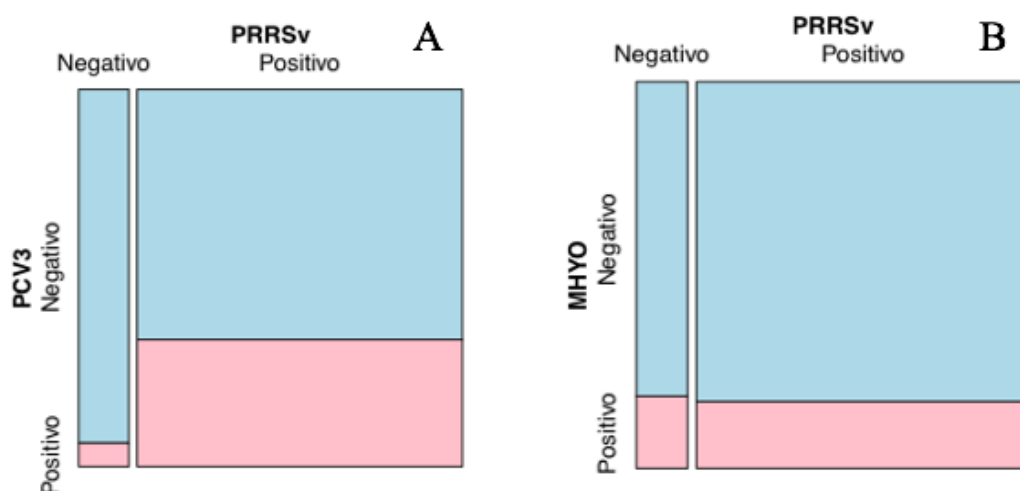


Figura 15 (a-b). Mosaic plot che mettono in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 e PRRSV (a) e di Mhyo e PRRSV (b).

Per quanto riguarda le coinfezioni tra PCV3 e PRRSV, la maggior frequenza di PCV3 rispetto a quella attesa nei campioni positivi per PRRSV è tale da essere statisticamente significativa (fig. 15a). Questo dato è ulteriormente corroborato dal fatto che la frequenza delle positività per Mhyo (patogeno noto per le sue interazioni con PRRSV) non risulta influenzata dalla presenza o meno di PRRSV (fig. 15b), facendo pensare che il *bias* dovuto al campionamento sia in questo caso trascurabile. In ogni caso, l'accertamento del significato eziopatogenetico di questa associazione necessita di ulteriori studi sperimentali.

5.2.5. SINTOMI E REPERTI NECROSCOPICI

I campioni analizzati si dividevano tra quelli prelevati durante la normale attività di controllo, per cui spesso non erano disponibili dati anamnestici precisi, ed altri relativi a sospetti clinici che necessitavano ulteriori indagini. In quest'ultimo caso erano stati catalogati i segni clinici mostrati dagli animali ed i reperti anatomopatologici ottenuti all'esame necroscopico.

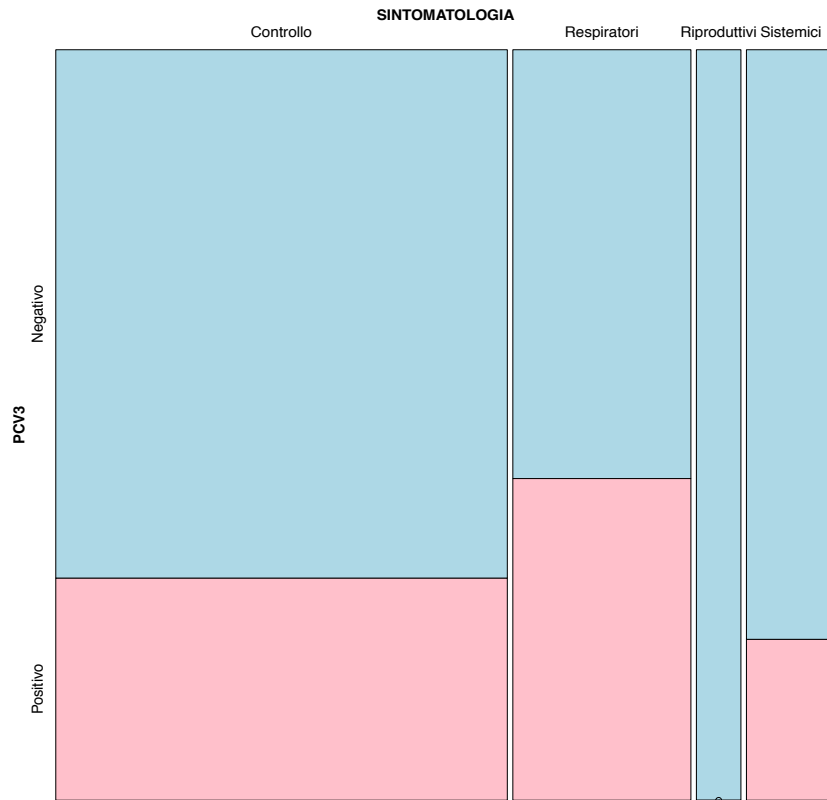


Figura 16. Mosaic plot che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 con l'anamnesi raccolta.

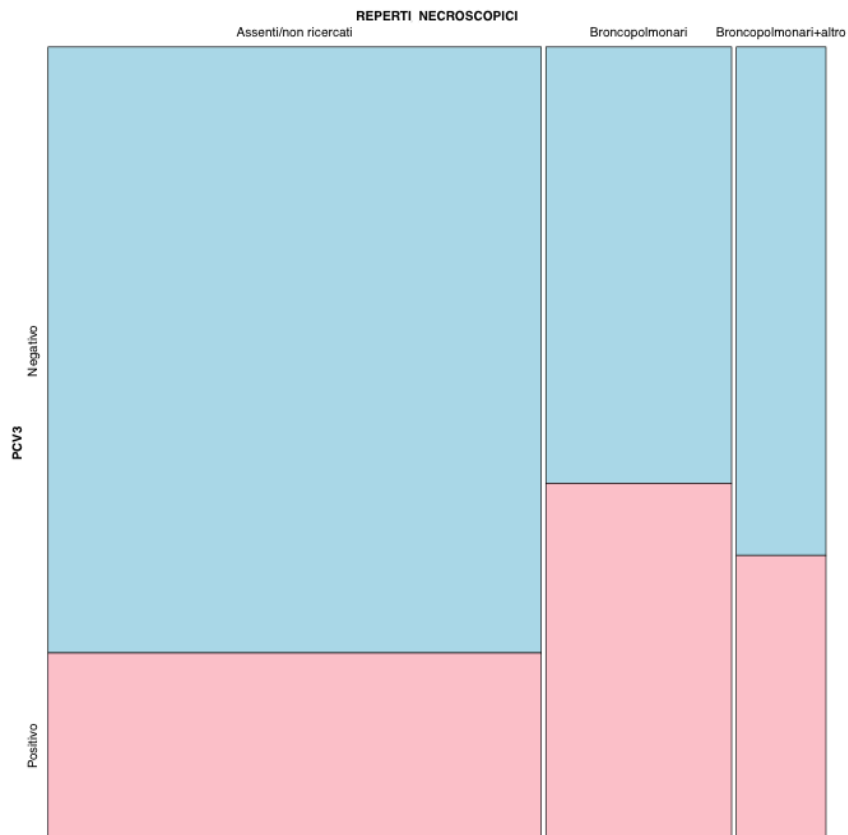


Figura 17. Mosaic plot che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 ed i referti necroscopici.

La frequenza con cui PCV3 è stato rinvenuto risulta maggiore rispetto alle attese in campioni prelevati in presenza di sintomatologia (fig. 16). Anche il rilievo alla necropsia di lesioni a livello broncopolmonare (da sole o accompagnate da rilievi patologici in altre sedi) è associato ad una incidenza di PCV3 maggiore di quanto attribuibile all'effetto del caso (fig. 17). Queste differenze non si sono tuttavia rivelate significative dal punto di vista statistico e, alla luce della natura del campionamento, non è possibile affermare che siano dovute a fondate ragioni eziopatogenetiche; più facile è supporre che le differenze osservate siano dovute almeno in parte all'effetto confondente della matrice campionata. Da notare come nessuno dei campioni in cui è stato ritrovato PCV3 sia legato a turbe riproduttive, che precedenti studi hanno già associato a PCV3 (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017).

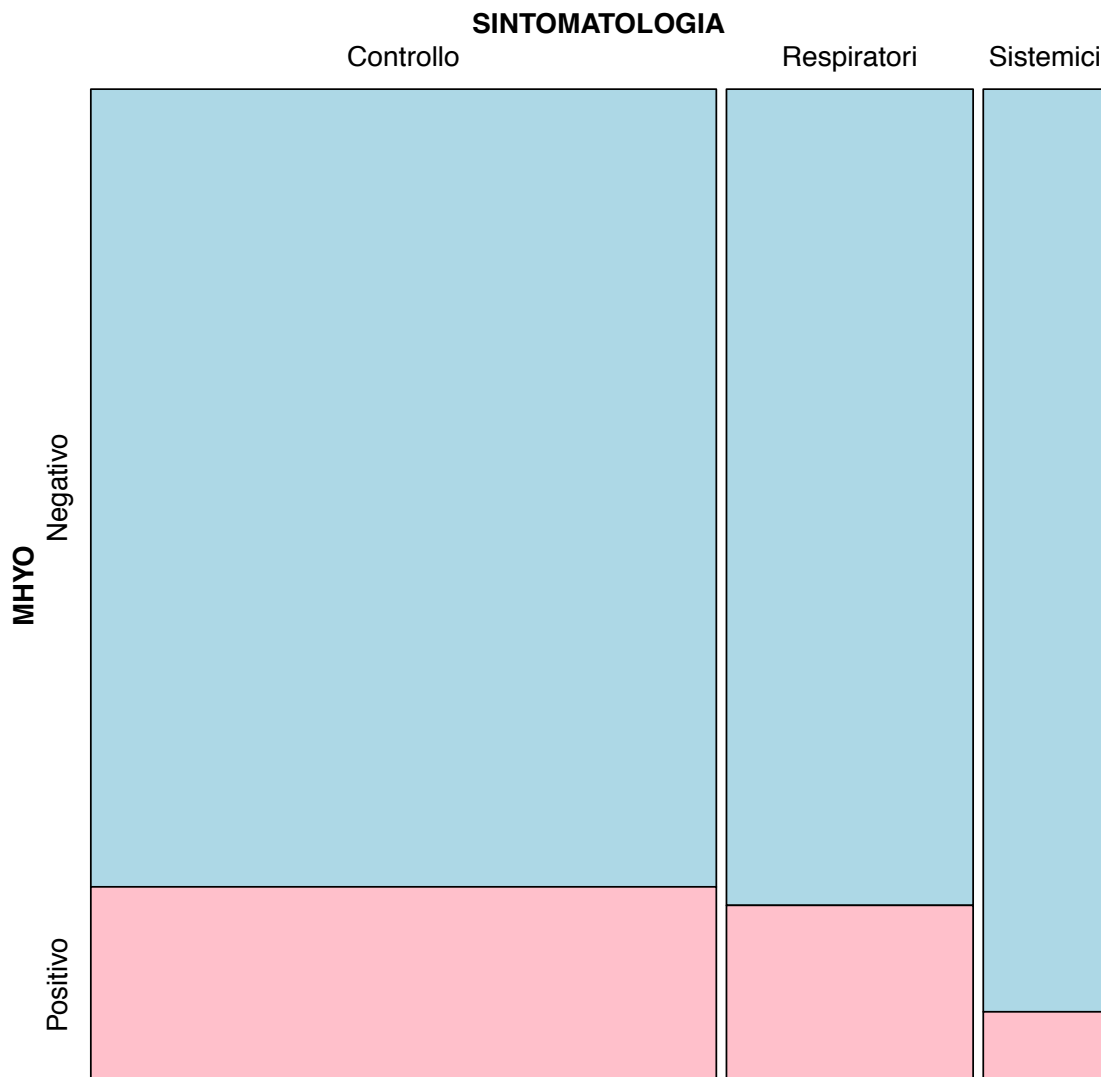


Figura 18. Mosaic plot che mette in relazione gli esiti della ricerca di Mhyo con l'anamnesi legata al prelievo.

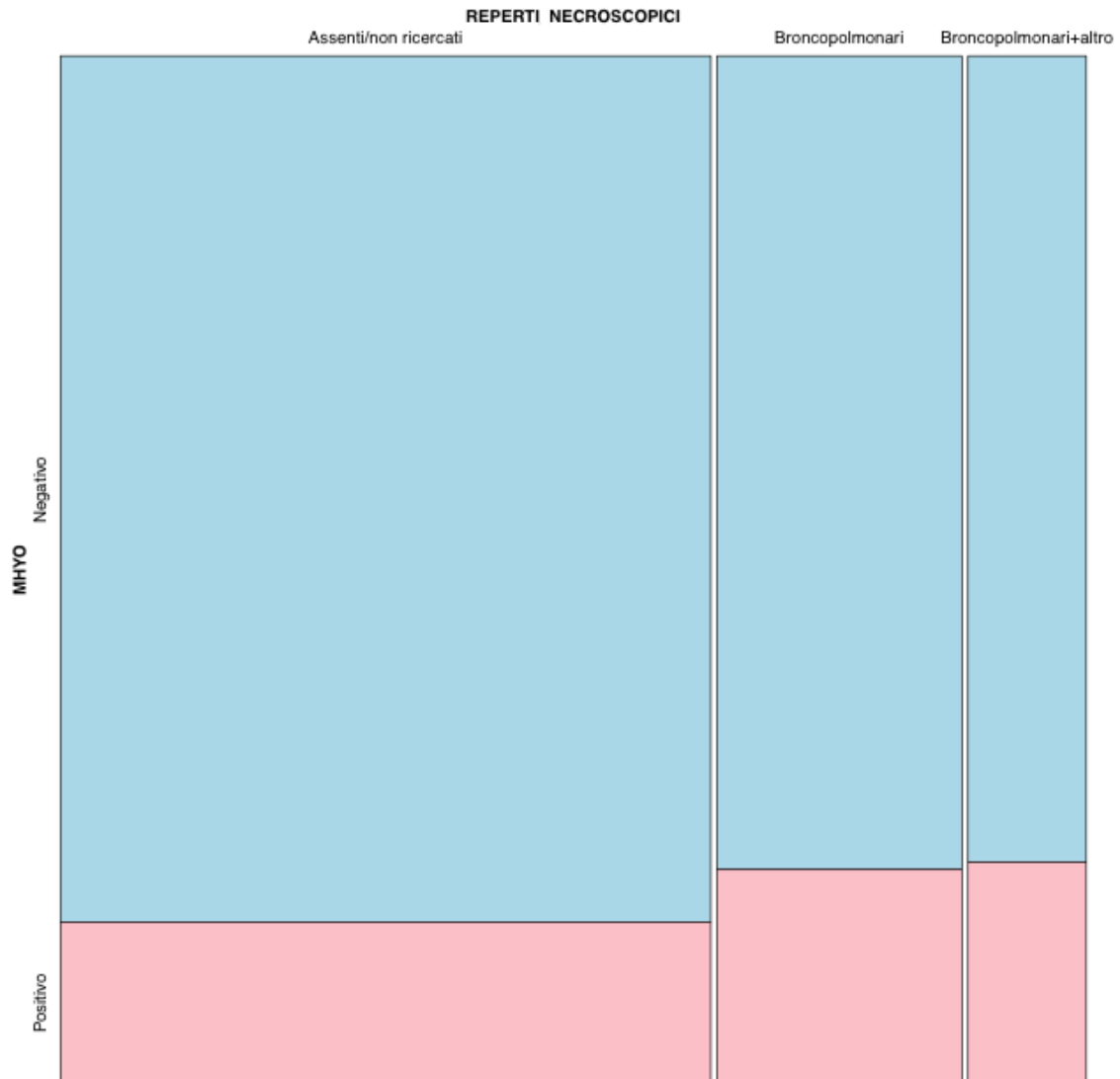


Figura 19. Mosaic plot che mette in relazione gli esiti della ricerca di Mhyo con i reperti necroscopici.

Anche la frequenza con cui è stato rinvenuto Mhyo non presenta differenze statisticamente significative a prescindere dalla presenza o meno di sintomi (fig. 18) o di reperti necroscopici (fig. 19), nonostante questo batterio reciti un ruolo chiave in numerosi meccanismi patogenetici a livello respiratorio. Ciò può forse spiegarsi considerando che l'85% dei campioni positivi per Mhyo (e l'87% dei campioni totali) risultavano positivi anche per PRRSV: in questo caso il ruolo di Mhyo non è quello classico di "door-opener", quanto piuttosto quello di fattore complicante l'infezione virale (Thacker et al., 1999). Non essendo previsto uno *scoring* di sintomi e lesioni, essi risulterebbero quindi presenti a prescindere da Mhyo, il quale avrebbe il solo effetto di aggravarli. Pur in assenza di dati sui protocolli vaccinali adottati nei diversi allevamenti,

non è da escludersi che anche la profilassi indiretta reciti un ruolo in tal senso: essa è infatti in grado di ridurre significativamente l'entità di sintomi e lesioni respiratori, ma non di evitare la colonizzazione né diminuire la trasmissione (Haesebrouck et al., 2004).

5.2.6. SEQUENZIAMENTO DI PCV3

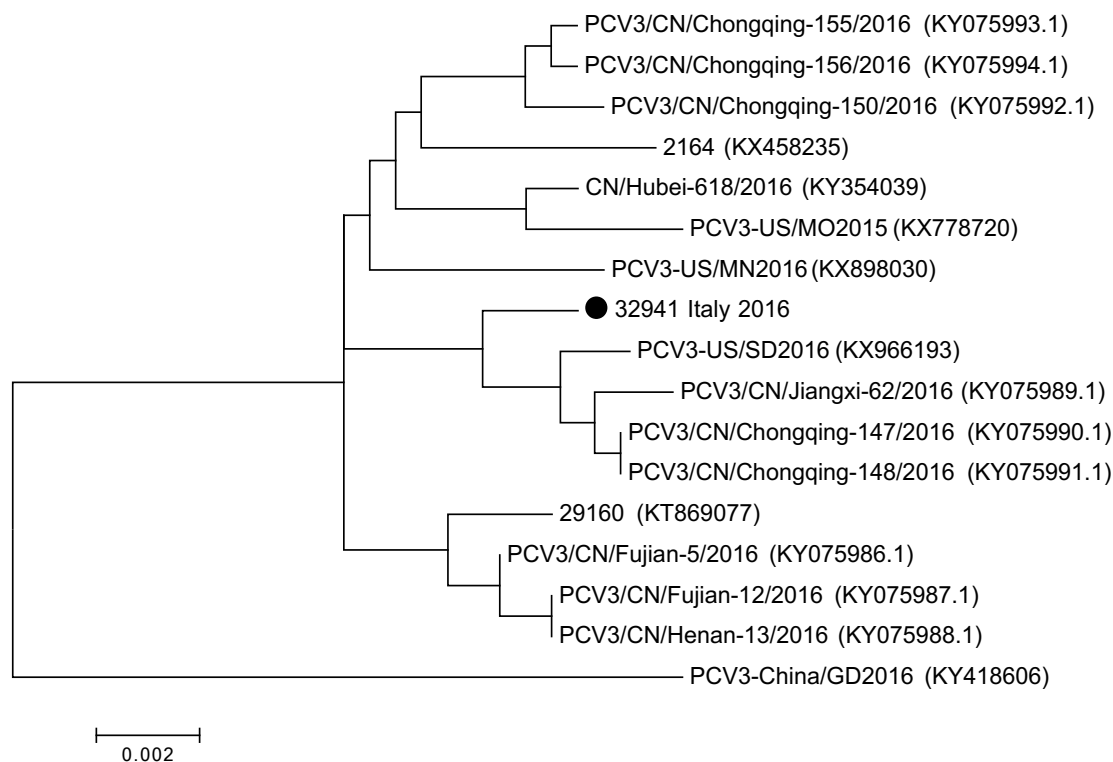


Figura 20. Albero filogenetico raggruppante tutte le sequenze di PCV3 conosciute. La sequenza evidenziata è stata ottenuta a partire dal campione 32941. L'albero è stato costruito con il software MEGA7 (Kumar et al., 2016), applicando l'approccio di *Maximum Likelihood*, basato sul modello Tamura-Nei, a sequenze precedentemente allineate con il metodo *MUSCLE*.

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

La sequenza ottenuta, seppur chiaramente interna allo stesso *clade* raggruppante gli altri genomi conosciuti di PCV3, risulta diversa da quelle cinesi e statunitensi attualmente

note. Particolarmente importante è la distanza genetica dalla sequenza 29160, dalla quale è stato ricavato il controllo positivo utilizzato in questo lavoro, attestante l'assenza di false positività dovute a cross-contaminazioni.

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

6. CONCLUSIONI

Il primo e principale obiettivo di questo studio era di natura marcatamente pratica: mettere a disposizione una metodica che potesse rappresentare un'alternativa concreta a quelle attualmente impiegate per la ricerca di *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e di *Porcine circovirus type 3* (PCV3). In quest'ottica, l'adozione di protocolli basati su *direct PCR* offre indiscutibili vantaggi: oltre ad essere pienamente attuabili nella pratica laboratoristica quotidiana, essi si sono rivelati estremamente convenienti sia dal punto di vista dei costi che dei tempi necessari alle analisi. Non essendo richiesto l'impiego di kit di estrazione, la durata delle prove diagnostiche risulta infatti sostanzialmente dimezzata (con un beneficio tanto maggiore quanto il numero dei campioni è alto); il risparmio economico, considerando anche il minor consumo di materiale monouso come puntali e provette, è grossolanamente stimabile sui 3-4 € per singolo campione. La validazione dei protocolli ha infine permesso di attestarne le performance, rivelatesi comparabili con quelle garantite da saggi di PCR tradizionali.

Emerge quindi chiaramente la competitività delle metodiche prese in esame. Ciò vale in particolare per quanto concerne PCV3: collocandosi in un contesto di ricerca ancora largamente inesplorato e in cui le alternative già validate sono poche, un protocollo del genere potrebbe risultare estremamente utile per lo *screening* di grandi quantitativi di campioni.

Una volta accertata l'accuratezza dei metodi diagnostici, essi sono stati applicati su campioni sperimentali provenienti da una delle maggiori realtà produttive del Norditalia. Mettendo in relazione gli esiti della ricerca di Mhyo e PCV3 con le informazioni disponibili in merito ai succitati campioni, è stato possibile estrapolare numerosi dati sull'epidemiologia dei due microrganismi.

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

di sintomi e lesioni respiratori è probabilmente da attribuirsi ad un *bias* di campionamento.

Diversa è la situazione in merito a PCV3: trattandosi di un virus scoperto solo recentemente, molti aspetti della sua epidemiologia risultano ancora oscuri. Questo studio ha permesso di muovere i primi passi in tal senso, a partire dal rinvenimento di PCV3 sul territorio italiano, un dato di assoluta novità se si considera come gli unici studi in merito siano relativi a Cina e Stati Uniti. Le numerose positività riscontrate dimostrano peraltro la comune circolazione di PCV3, la quale rappresenta solo uno dei molti punti di contatto tra l'epidemiologia di PCV3 e quella dell'ubiquitario *Porcine circovirus type 2* (PCV2).

Tra le altre informazioni ricavate si annoverano la presenza di un picco di frequenze di PCV3 in soggetti dall'età compresa tra le 5 e le 8 settimane, il rinvenimento a partire da matrici mai testate prima e la presenza in coinfezione con vari patogeni sia virali che batterici; è stata inoltre attestata un'associazione statisticamente significativa tra le positività per PCV3 e quelle per *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV). Per una piena comprensione del significato di questi risultati, e quindi della reale importanza eziopatogenetica di PCV3, saranno ovviamente necessari ulteriori studi sperimentali, scevri dalle limitazioni che hanno connotato questo progetto. I dati raccolti rappresentano comunque un promettente punto d'inizio per lo studio di questo microrganismo.

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

Come già accennato, i limiti di questo studio risultano legati alla natura del campionamento (non sistematico ma di convenienza), che non ha permesso l'elaborazione di dati di prevalenza né una ottimale analisi statistica di molti dei dati raccolti.

Se per quanto riguarda Mhyo la situazione epidemiologica appare stabile e ormai ben definita, più interessante potrebbe essere proseguire in futuro quanto iniziato in questo progetto relativamente allo studio di un microrganismo emergente e potenzialmente rilevante come PCV3.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adams, C., Pitzer, J., Minion, F.C., 2005. In Vivo Expression Analysis of the P97 and P102 Paralog Families of *Mycoplasma hyopneumoniae* In Vivo Expression Analysis of the P97 and P102 Paralog Families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect. Immun.* 73, 7784–7787.
- Alarcon, P., Rushton, J., Wieland, B., 2013. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – An economic disease model. *Prev. Vet. Med.* 110, 88–102.
- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine Circoviruses: A Review. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 12, 3–14.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A.C., Adair, B., Ellis, W.A., McNulty, M.S., 1995. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet. Microbiol.* 44, 49–64.
- Artiushin, S., Stipkovits, L., Minion, F.C., 1993. Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol. Cell. Probes* 7, 381–5.
- Assunção, P., Fe, C.D. la, Ramírez, A.S., Llamazares, O.G., Poveda, J.B., 2005. Protein and Antigenic Variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* Strains by SDS-PAGE and Immunoblot. *Vet. Res. Commun.* 29, 563–574.
- Baekbo, P., Kooij, D., Mortensen, S., Barfod, K., Mousing, J., 1996. Economic evaluation of national eradication and control strategies for *Mycoplasma hyopneumoniae* in Denmark. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 90, 63–5.
- Baekbo, P., Kristensen, C.S., Larsen, L.E., 2012. Porcine Circovirus Diseases: A review of PMWS. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 60–67.
- Batista, L., Pijoan, C., Ruiz, A., Utrera, V., Dee, S., 2004. Assessment of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* by personnel. *J. Swine Heal. Prod.* 12, 75–77.
- Batista Linhares, M., Belloy, L., Origgi, F.C., Lechner, I., Segner, H., Ryser-Degiorgis, M.-P., 2015. Investigating the role of free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in the re-emergence of enzootic pneumonia in domestic pig herds: a pathological, prevalence

- and risk-factor study. *PLoS One* 10, e0119060.
- Baumeister, A.K., Runge, M., Ganter, M., Feenstra, A.A., Delbeck, F., Kirchhoff, H., 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1984–8.
- Baylis, S.A., Finsterbusch, T., Bannert, N., Blümel, J., Mankertz, A., 2011. Analysis of porcine circovirus type 1 detected in Rotarix vaccine. *Vaccine* 29, 690–697.
- Beach, N.M., Córdoba, L., Kenney, S.P., Meng, X.-J., 2011. Productive infection of human hepatocellular carcinoma cells by porcine circovirus type 1. *Vaccine* 29, 7303–7306.
- Beach, N.M., Meng, X.-J., 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164, 33–42.
- Bereiter, M., Young, T.F., Joo, H.S., Ross, R.F., 1990. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Vet. Microbiol.* 25, 177–92.
- Blanchard, B., Kobisch, M., Bové, J.M., Saillard, C., 1996. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Mol. Cell. Probes* 10, 15–22.
- Boettcher, T.B., Thacker, B.J., Halbur, P.G., Waters, W.R., Nutsch, R., Thacker, E.L., 2002. Vaccine efficacy and immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae* challenge in pigs vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *M. hyopneumoniae*. *J. Swine Heal. Prod.* 10, 259–264.
- Bogema, D.R., Scott, N.E., Padula, M.P., Tacchi, J.L., Raymond, B.B.A., Jenkins, C., Cordwell, S.J., Minion, F.C., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2011. Sequence TTKF ↓ QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 286, 41217–29.
- Bourry, O., Fablet, C., Simon, G., Marois-Cr??han, C., 2015. Efficacy of combined vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in dually infected pigs. *Vet. Microbiol.* 180, 230–236.

- Browning, G.F., Marena, M.S., Noormohammadi, A.H., Markham, P.F., 2011. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. *Vet. Microbiol.* 153, 44–50.
- Burch, D.G., Jones, G.T., Heard, T.W., Tuck, R.E., 1986. The synergistic activity of tiamulin and chlortetracycline: in-feed treatment of bacterially complicated enzootic pneumonia in fattening pigs. *Vet. Rec.* 119, 108–12.
- Bürgi, E., Seiz, O., Bertschinger, H.U., 1990. Lack of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* from dam to fetus in experimentally infected pregnant gilts. *Proceedings, Int. Pig Vet. Soc. 11th Congr. July 1-5, 1990, Lausanne, Switzerland.*
- Burnett, T.A., Dinkla, K., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Uphoff, C., Srivastava, M., Cordwell, S.J., Geary, S., Liao, X., Minion, F.C., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2006. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Mol. Microbiol.* 60, 669–86.
- Cai, H.Y., van Dreumel, T., McEwen, B., Hornby, G., Bell-Rogers, P., McRaid, P., Josephson, G., Maxie, G., 2007. Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 91–5.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C., 2000. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Vet. Rec.* 146, 530–2.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C., Trigo, A., 1999. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 251, 246–251.
- Calsamiglia, M., Segalés, J., Quintana, J., Rosell, C., Domingo, M., 2002. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1848–50.
- Calus, D., Baele, M., Meyns, T., de Kruif, A., Butaye, P., Decostere, A., Haesebrouck, F., Maes, D., 2007. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Vet. Microbiol.* 120, 284–291.
- Cardona, A.C., Pijoan, C., Dee, S.A., 2005. Assessing *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol movement at several distances. *Vet. Rec.* 156, 91–2.

- Carman, S., Cai, H.Y., DeLay, J., Youssef, S.A., McEwen, B.J., Gagnon, C.A., Tremblay, D., Hazlett, M., Lulis, P., Fairles, J., Alexander, H.S., 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.* 72, 259–68.
- Caron, J., Ouardani, M., Dea, S., 2000. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1390–6.
- Caruso, J.P., Ross, R.F., 1990. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am. J. Vet. Res.* 51, 227–31.
- Chae, C., 2016. Porcine respiratory disease complex : Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2 , porcine reproductive and respiratory syndrome virus , and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. J.* 212, 1–6.
- Chae, C., 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet. J.* 169, 326–336.
- Chen, A.Y., Fry, S.R., Daggard, G.E., Mukkur, T.K.S., 2008. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine* 26, 4372–4378.
- Cheung, A.K., 2007. A stem-loop structure, sequence non-specific, at the origin of DNA replication of porcine circovirus is essential for termination but not for initiation of rolling-circle DNA replication. *Virology* 363, 229–235.
- Cino-Ozuna, A.G., Henry, S., Hesse, R., Nietfeld, J.C., Bai, J., Scott, H.M., Rowland, R.R.R., 2011. Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2012–6.
- Ciprián, A., Palacios, J.M., Quintanar, D., Batista, L., Colmenares, G., Cruz, T., Romero, A., Schnitzlein, W., Mendoza, S., 2012. Florfenicol feed supplemented decrease the clinical effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection in swine in México. *Res. Vet. Sci.* 92, 191–6.
- Cook, B.S., Beddow, J.G., Manso-Silvan, L., Maglennon, G.A., Rycroft, A.N., 2016.

- Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 195, 158–164.
- Cooper, A.C., Fuller, J.R., Fuller, M.K., Whittlestone, P., Wise, D.R., 1993. In vitro activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasmas of veterinary importance. *Res. Vet. Sci.* 54, 329–34.
- 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.* 187, 363–368.
- Cortey, M., Segalés, J., 2012. Low levels of diversity among genomes of Porcine circovirus type 1 (PCV1) points to differential adaptive selection between Porcine circoviruses. *Virology* 422, 161–164.
- Davies, B., Wang, X., Dvorak, C.M.T., Marthaler, D., Murtaugh, M.P., 2016. Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster. *Virus Res.* 217, 32–37.
- Davies, P.R., Bahnson, P.B., Grass, J.J., Marsh, W.E., Dial, G.D., 1995. Comparison of methods for measurement of enzootic pneumonia lesions in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 56, 09–14.
- DeBey, M.C., Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* 62, 5312–5318.
- Delwart, E., Li, L., 2012. Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus Res.* 164, 114–121.
- Djordjevic, S.P., Cordwell, S.J., Djordjevic, M.A., Wilton, J., Minion, F.C., 2004. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect. Immun.* 72, 2791–802.
- Dorr, P.M., Baker, R.B., Almond, G.W., Wayne, S.R., Gebreyes, W.A., 2007. Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 244–50.
- Drew, T.W., 2011. The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity? *Rev. Sci. Tech.* 30, 95–106.

- Dubin, G., Toussaint, J.-F., Cassart, J.-P., Howe, B., Boyce, D., Friedland, L., Abu-Elyazeed, R., Poncelet, S., Han, H.H., Debrus, S., 2013. Investigation of a regulatory agency enquiry into potential porcine circovirus type 1 contamination of the human rotavirus vaccine, Rotarix: approach and outcome. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9, 2398–408.
- Dubosson, C.R., Conzelmann, C., Miserez, R., Boerlin, P., Frey, J., Zimmermann, W., Häni, H., Kuhnert, P., 2004. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Vet. Microbiol.* 102, 55–65.
- Dupont, K., Nielsen, E.O., Bækbo, P., Larsen, L.E., 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.* 128, 56–64.
- Erlandson, K.R., Evans, R.B., Thacker, B.J., Abvp, D., Wegner, M.W., Thacker, E.L., Acvm, D., 2005. Peer reviewed Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae* 13, 198–203.
- Fablet, C., Marois, C., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N., 2010. Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Vet. Microbiol.* 143, 238–245.
- Fan, S., Ku, X., Chen, F., Wang, Y., Yu, X., He, Q., 2017. Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Circovirus Type 3 Strain, PCV3/CN/Hubei-618/2016, Isolated from China. *Genome Announc.* 5, e00100-17.
- Faurez, F., Dory, D., Grasland, B., Jestin, A., 2009. Replication of porcine circoviruses. *Virology* 6, 60.
- Feng, H., Blanco, G., Segalés, J., Sibila, M., 2014. Can Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection be eradicated by mass vaccination? *Vet. Microbiol.* 172, 92–99.
- Feng, Z.-X., Wei, Y.-N., Li, G.-L., Lu, X.-M., Wan, X.-F., Pharr, G.T., Wang, Z.-W., Kong, M., Gan, Y., Bai, F.-F., Liu, M.-J., Xiong, Q.-Y., Wu, X.-S., Shao, G.-Q., 2013. Development and validation of an attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol vaccine. *Vet. Microbiol.* 167, 417–424.
- Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J.*

- Virol. 83, 12813–21.
- Fournié, G., Kearsley-Fleet, L., Otte, J., Pfeiffer, D.U., 2015. Spatiotemporal trends in the discovery of new swine infectious agents. *Vet. Res.* 46, 114.
- Franzo, G., Cortey, M., Castro, A.M.M.G. de, Piovezan, U., Szabo, M.P.J., Drigo, M., Segalés, J., Richtzenhain, L.J., 2015. Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. *Vet. Microbiol.* 178, 158–162.
- Franzo, G., Cortey, M., Segalés, J., Hughes, J., Drigo, M., 2016a. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Mol. Phylogenet. Evol.* 100, 269–280.
- Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Drigo, M., 2016b. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Sci. Rep.* 6, 39458.
- Frey, J., Haldimann, A., Nicolet, J., 1992. Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 275–80.
- Friis, N.F., 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord. Vet. Med.* 27, 337–9.
- Galindo-Cardiel, I., Grau-Roma, L., Pérez-Maíllo, M., Segalés, J., 2011. Characterization of Necrotizing Lymphadenitis Associated with Porcine Circovirus Type 2 Infection. *J. Comp. Pathol.* 144, 63–69.
- Galli, V., Simionatto, S., Marchioro, S.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., 2012. Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. *Vaccine* 31, 135–140.
- Giacomini, E., Ferrari, N., Pitozzi, A., Remistani, M., Giardiello, D., Maes, D., Alborali, G.L., 2016. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* seroconversion and infection in pigs in the three main production systems. *Vet. Res. Commun.* 40, 81–88.
- Gibbs, M.J., Weiller, G.F., 1999. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8022–7.

- Gilliland, S.M., Forrest, L., Carre, H., Jenkins, A., Berry, N., Martin, J., Minor, P., Schepelmann, S., 2012. Investigation of porcine circovirus contamination in human vaccines. *Biologicals* 40, 270–277.
- Godinho, K.S., 2008. Susceptibility testing of tulathromycin: Interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates. *Vet. Microbiol.* 129, 426–432.
- Goodwin, R.F., 1972. Isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae from the nasal cavities and lungs of pigs affected with enzootic pneumonia or exposed to this infection. *Res. Vet. Sci.* 13, 262–7.
- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., López-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segalés, J., 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet. Microbiol.* 128, 23–35.
- 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.* 187, 23–32.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A., 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet. Microbiol.* 100, 255–268.
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72, 5262–7.
- Han, H.H., Karkada, N., Jayadeva, G., Dubin, G., 2017. Serologic response to porcine circovirus type 1 (PCV1) in infants vaccinated with the human rotavirus vaccine, Rotarix™: A retrospective laboratory analysis. *Hum. Vaccin. Immunother.* 13, 237–244.
- Hannan, P.C., Goodwin, R.F., 1990. Treatment of experimental enzootic pneumonia of the pig by norfloxacin or its 6-chloro analogue. *Res. Vet. Sci.* 49, 203–10.
- Hannan, P.C., O’Hanlon, P.J., Rogers, N.H., 1989. In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Res. Vet. Sci.* 46, 202–11.

- Hansen, M.S., Pors, S.E., Jensen, H.E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E.M., Nielsen, O.L., 2010. An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark. *J. Comp. Pathol.* 143, 120–131.
- Harasawa, R., Koshimizu, K., Takeda, O., Uemori, T., Asada, K., Kato, I., 1991. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* 5, 103–9.
- Harding, J.C.S., Clark, E.G., 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Heal. Prod.* 5, 201–203.
- Hege, R., Zimmermann, W., Scheidegger, R., Stärk, K.D.C., 2002. Incidence of reinfections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig farms located in respiratory-disease-free regions of Switzerland--identification and quantification of risk factors. *Acta Vet. Scand.* 43, 145–56.
- Heinonen, M., Autio, T., Saloniemi, H., Tuovinen, V., 1999. Eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from infected swine herds joining the LSO 2000 health class. *Acta Vet. Scand.* 40, 241–52.
- Huang, Y.-L., Pang, V., Lin, C.-M., Tsai, Y.-C., Chia, M.-Y., Deng, M.-C., Chang, C.-Y., Jeng, C.-R., 2011. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection decreases the efficacy of an attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine. *Vet. Res.* 42, 115.
- Ishag, H.Z.A., Wu, Y.Z., Liu, M.J., Xiong, Q.Y., Feng, Z.X., Yang, R.S., Shao, G.Q., 2016. In vitro protective efficacy of Lithium chloride against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Res. Vet. Sci.* 106, 93–96.
- 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.* 138, 27–33.
- Kappe, E.C., Halami, M.Y., Schade, B., Alex, M., Hoffmann, D., Gangl, A., Meyer, K., Dekant, W., Schwarz, B.-A., Johne, R., Buitkamp, J., Böttcher, J., Müller, H., 2010. Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berl.*

- Munch. Tierarztl. Wochenschr. 123, 31–41.
- Kawashima, K., Tsunemitsu, H., Horino, R., Katsuda, K., Onodera, T., Shoji, T., Kubo, M., Haritani, M., Murakami, Y., 2003. Effects of dexamethasone on the pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection in piglets. *J. Comp. Pathol.* 129, 294–302.
- Kim, J., Chae, C., 2005. Necrotising lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 in pigs. *Vet. Rec.* 156, 177–8.
- Kim, J., Chung, H.-K., Chae, C., 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet. J.* 166, 251–256.
- King, K.W., Faulds, D.H., Rosey, E.L., Yancey, R.J., 1997. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine* 15, 25–35.
- Krakovka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Gilpin, D., Meehan, B., McCullough, K., Allan, G., 2002. Immunologic Features of Porcine Circovirus Type 2 Infection. *Viral Immunol.* 15, 567–582.
- Krakovka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D.M., 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.* 38, 31–42.
- Kristensen, C.S., Hjulsager, C.K., Vestergaard, K., Dupont, K., Bille-Hansen, V., Enøe, C., Jorsal, S.E., Bækbo, P., Larsen, L.E., 2013. Experimental airborne transmission of porcine postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Pathog.* 2013, 534342.
- Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Qian, P., Wu, M., He, Q., 2017. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transbound. Emerg. Dis.*
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Kurth, K., Hsu, T., Snook, E., 2002. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *J. Vet. Diagn. Inves.* 14, 463–469.
- Kwon, D., Chae, C., 1999. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae*

- DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Vet. Pathol.* 36, 308–13.
- Law, J., McCorkell, R., Muench, G., Wynne-Edwards, K., Schaetzl, H.M., Solis, C., Nourozieh, N., Waeckerlin, R., Eschbaumer, M., Horsman, S., Czub, M., 2017. Induction of humoral immune response in piglets after perinatal or post-weaning immunization against porcine circovirus type-2 or keyhole limpet hemocyanin. *Can. J. Vet. Res.* 81, 5–11.
- Le Carrou, J., Laurentie, M., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A. V., 2006. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Experimentally Infected Pigs after Marbofloxacin Treatment and Detection of Mutations in the parC Gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1959–1966.
- Le Grand, A., Kobisch, M., 1996. Comparison of the use of a vaccine and sequential antibiotic treatment in a herd infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res.* 27, 241–53.
- Li, J., Yu, T., Zhang, F., Wang, X., Zhou, J., Gao, X., Gao, S., Liu, X., 2016. Inactivated chimeric porcine circovirus (PCV) 1-2 vaccines based on genotypes 2b and 2d exhibit similar immunological effectiveness in protecting pigs against challenge with PCV2b strain 0233. *Arch. Virol.* 162, 1–12.
- Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O.S., Wang, C., Shaukat, S., Masroor, M.A., Wilson, M.L., Ndjango, J.-B.N., Peeters, M., Gross-Camp, N.D., Muller, M.N., Hahn, B.H., Wolfe, N.D., Triki, H., Bartkus, J., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2010. Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces. *J. Virol.* 84, 1674–1682.
- Li, L., Shan, T., Soji, O.B., Alam, M.M., Kunz, T.H., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2011. Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. *J. Gen. Virol.* 92, 768–72.
- Lin, J.H., Pan, M.J., Liao, C.W., Weng, C.N., 2002. In vivo and in vitro comparisons of spray-drying and solvent- evaporation preparation of microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* for use as an orally administered vaccine for pigs. *Am. J. Vet. Res.* 63, 1118–23.
- Liu, M.J., Du, G.M., Bai, F.F., Wu, Y.Z., Xiong, Q.Y., Feng, Z.X., Li, B., Shao, G.Q.,

2015. A rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification procedure (LAMP) for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection based on the p36 gene. *Genet. Mol. Res.* 14, 4677–4686.
- Liu, W., Feng, Z., Fang, L., Zhou, Z., Li, Q., Li, S., Luo, R., Wang, L., Chen, H., Shao, G., Xiao, S., 2011. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain 168. *J. Bacteriol.* 193, 1016–1017.
- Lorenzo, H., Quesada, O., Assunção, P., Castro, A., Rodríguez, F., 2006. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109, 199–207.
- Lórinicz, M., Cságola, A., Biksi, I., Szeredi, L., Dán, Á., Tuboly, T., 2010. Detection of porcine circovirus in rodents — Short communication. *Acta Vet. Hung.* 58, 265–268.
- Lv, Q., Guo, K., Zhang, Y., 2014. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes* 49, 1–10.
- Madec, F., Rose, N., Eveno, E., Morvan, P., Larour, G., Jolly, J., Le Digerher, G., Cariolet, R., Le Dimna, M., Blanchard, P., Jestin, A., 2001. PWMS: on-farm observations and preliminary analytic epidemiology, in: *Proceedings of the ssDNA Viruses Plant, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting.* pp. 86–87.
- Madsen, M.L., Oneal, M.J., Gardner, S.W., Strait, E.L., Nettleton, D., Thacker, E.L., Minion, F.C., 2007. Array-based genomic comparative hybridization analysis of field strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Bacteriol.* 189, 7977–82.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Lein, A., Vrijens, B., de Kruif, A., 1998. The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 45, 495–505.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B., Verbeke, W., Viaene, J., De Kruif, A., 1999. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine* 17, 1024–1034.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet. Microbiol.* 126, 297–309.

- Maes, D., Verbeke, W., Vicca, J., Verdonck, M., de Kruif, A., 2003. Benefit to cost of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds under Belgina market conditions from 1996 to 2000. *Livest Prod Sci* 85–93.
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., de Kruif, A., 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet. Q.* 18, 104–9.
- Marois, C., Dory, D., Fablet, C., Madec, F., Kobisch, M., 2010. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1523–1533.
- Marois, C., Le Carrou, J., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A. V., 2007. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet. Microbiol.* 120, 96–104.
- Martelli, P., Terreni, M., Guazzetti, S., Cavirani, S., 2006. Antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 229–33.
- Mateusen, B., Maes, D., Hoflack, G., Verdonck, M., de Kruif, A., 2001. A comparative study of the preventive use of tilmicosin phosphate (Pulmotil premix) and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in a pig herd with chronic respiratory disease. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 48, 733–41.
- Mattsson, J.G., Bergström, K., Wallgren, P., Johansson, K.E., 1995. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 33, 893–7.
- Mayor, D., Zeeh, F., Frey, J., Kuhnert, P., 2007. Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material. *Vet. Res.* 38, 391–398.
- Meehan, B.M., Mcneilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79, 2171–2179.
- Meng, X.-J., 2013. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2): Pathogenesis and Interaction with

- the Immune System. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1, 43–64.
- Meng, X.-J., 2012. Spread like a wildfire—The omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs. *Virus Res.* 164, 1–3.
- Messier, S., Ross, R.F., 1991. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1497–502.
- Mészáros, J., Stipkovits, L., Antal, T., Szabó, I., Veszely, P., 1985. Eradication of some infectious pig diseases by perinatal tiamulin treatment and early weaning. *Vet. Rec.* 116, 8–12.
- Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F., Maes, D., 2006. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 24, 7081–7086.
- Meyns, T., Maes, D., Dewulf, J., Vicca, J., Haesebrouck, F., Kruif, A. de, 2004. Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. *Prev. Vet. Med.* 66, 265–275.
- Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M., Mahairas, G.G., 2004. The Genome Sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain 232, the Agent of Swine Mycoplasmosis. *J. Bacteriol.* 186, 7123–7133.
- Moorkamp, L., Nathues, H., Spergser, J., Tegeler, R., Grosse Beilage, E., 2008. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *Vet. J.* 175, 273–5.
- Morris, P., Morris, M., Sanford, S., 2001. Comparison of performance parameters of pigs vaccinated with Ingelvac® M. hyo 1-dose bacterin vs Respisure® *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin., in: *Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians.* pp. 157–162.
- Nathues, H., Woeste, H., Doehring, S., Fahrion, A.S., Doherr, M.G., Beilage, E. grosse, 2013. Herd specific risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Vet. Scand.* 55, 30.
- Nayar, G.P., Hamel, A.L., Lin, L., Sachvie, C., Grudeski, E., Spearman, G., 1999. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can.* 40, 277–8.

- Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Lukert, P.D., 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virol.* 143, 1723–44.
- Opriessnig, T., Fenaux, M., Thomas, P., Hoogland, M.J., Rothschild, M.F., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006a. Evidence of Breed-dependent Differences in Susceptibility to Porcine Circovirus Type-2-associated Disease and Lesions. *Vet. Pathol.* 43, 281–293.
- Opriessnig, T., Gerber, P.F., Xiao, C.-T., Mogler, M., Halbur, P.G., 2014. A commercial vaccine based on PCV2a and an experimental vaccine based on a variant mPCV2b are both effective in protecting pigs against challenge with a 2013 U.S. variant mPCV2b strain. *Vaccine* 32, 230–237.
- Opriessnig, T., Halbur, P.G., 2012. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res.* 164, 20–32.
- Opriessnig, T., Halbur, P.G., Yu, S., Thacker, E.L., Fenaux, M., Meng, X.J., 2006. Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Vet. Rec.* 158, 149–54.
- Opriessnig, T., McKeown, N.E., Harmon, K.L., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006b. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 923–9.
- Opriessnig, T., Meng, X.-J., Halbur, P.G., 2007. Porcine Circovirus Type 2–Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 19, 591–615.
- Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.-J., Halbur, P.G., 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 41, 624–40.
- Opriessnig, T., Xiao, C.-T., Halbur, P.G., Gerber, P.F., Matzinger, S.R., Meng, X.-J., 2017. A commercial porcine circovirus (PCV) type 2a-based vaccine reduces

- PCV2d viremia and shedding and prevents PCV2d transmission to naïve pigs under experimental conditions. *Vaccine* 35, 248–254.
- Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., Deen, J., 2010. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet. Microbiol.* 145, 198–208.
- Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, E., Hause, B.M., 2017. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *J. Virol.* 91, e01879-16.
- Patterson, A.R., Madson, D.M., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2011. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure. *Vet. Microbiol.* 149, 225–229.
- Patterson, R., Nevel, A., Diaz, A. V, Martineau, H.M., Demmers, T., Browne, C., Mavrommatis, B., Werling, D., 2015. Exposure to environmental stressors result in increased viral load and further reduction of production parameters in pigs experimentally infected with PCV2b. *Vet. Microbiol.* 177, 261–9.
- Pérez-Martín, E., Rovira, A., Calsamiglia, M., Mankertz, A., Rodríguez, F., Segalés, J., 2007. A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *J. Virol. Methods* 146, 86–95.
- Phan, T.G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F., Delwart, E., 2016. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol. J.* 13, 184.
- Pieters, M., Pijoan, C., Fano, E., Dee, S., 2009. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Vet. Microbiol.* 134, 261–266.
- Puvanendiran, S., Stone, S., Yu, W., Johnson, C.R., Abrahante, J., Jimenez, L.G., Griggs, T., Haley, C., Wagner, B., Murtaugh, M.P., 2011. Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds. *Virus Res.* 157, 92–98.
- Quintana, J., Segalés, J., Calsamiglia, M., Domingo, M., 2006. Detection of porcine

- circovirus type 1 in commercial pig vaccines using polymerase chain reaction. *Vet. J.* 171, 570–573.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramamoorthy, S., Meng, X.-J., 2009. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim. Heal. Res. Rev.* 10, 1–20.
- Rautiainen, E., Oravainen, J., Virolainen, J. V, Tuovinen, V., 2001. Regional eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from pig herds and documentation of freedom of the disease. *Acta Vet. Scand.* 42, 355–64.
- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1094–156.
- Rodríguez, F., Ramírez, G.A., Sarradell, J., Andrada, M., Lorenzo, H., 2004. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 130, 306–12.
- Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P., Varsani, A., 2017. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch. Virol.* 1–17.
- Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A., 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164, 78–89.
- Ross, R.F., Cox, D.F., 1988. Evaluation of tiamulin for treatment of mycoplasmal pneumonia in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 441–6.
- Saha, D., Lefebvre, D.J., Ducatelle, R., Doorsselaere, J. V, Nauwynck, H.J., 2011. Outcome of experimental porcine circovirus type 1 infections in mid-gestational porcine foetuses. *BMC Vet. Res.* 7, 64.
- Sanchez, R.E., Meerts, P., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2003. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet. Microbiol.* 95, 15–25.
- Segalés, J., 2015. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Rev. Vaccines* 14, 473–487.

- Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164, 10–19.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2012. Porcine Circoviruses, in: Zimmermann, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K. j, Stevenson, G.W. (Eds.), *Diseases of Swine*, 10th Edition. Wiley-Blackwell, Ames, pp. 405–417.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Heal. Res. Rev.* 6, 119–142.
- Segalés, J., Kekarainen, T., Cortey, M., 2013. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Vet. Microbiol.* 165, 13–20.
- Seymour, L.M., Deutscher, A.T., Jenkins, C., Kuit, T.A., Falconer, L., Minion, F.C., Crossett, B., Padula, M., Dixon, N.E., Djordjevic, S.P., Walker, M.J., 2010. A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *J. Biol. Chem.* 285, 33971–33978.
- Seymour, L.M., Falconer, L., Deutscher, A.T., Minion, F.C., Padula, M.P., Dixon, N.E., Djordjevic, S.P., Walker, M.J., 2011. Mhp107 Is a Member of the Multifunctional Adhesin Family of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 286, 10097–10104.
- Seymour, L.M., Jenkins, C., Deutscher, A.T., Raymond, B.B.A., Padula, M.P., Tacchi, J.L., Bogema, D.R., Eamens, G.J., Woolley, L.K., Dixon, N.E., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2012. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cell. Microbiol.* 14, 81–94.
- Shen, H., Liu, X., Zhang, P., Wang, L., Liu, Y., Zhang, L., Liang, P., Song, C., 2017. Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China. *Transbound. Emerg. Dis.* 0, 1–3.
- Shen, H., Wang, C., Madson, D.M., Opriessnig, T., 2010. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Prev. Vet. Med.* 97, 228–236.
- Shibata, I., Okada, M., Urono, K., Samegai, Y., Ono, M., Sakano, T., Sato, S., 1998. Experimental dual infection of cesarean-derived, colostrum-deprived pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* and pseudorabies virus. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 295–300.

- Sibila, M., Bernal, R., Torrents, D., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia, M., Segalés, J., 2008. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Vet. Microbiol.* 127, 165–170.
- Sibila, M., Calsamiglia, M., Vidal, D., Badiella, L., Aldaz, A., Jensen, J.C., 2004. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Can. J. Vet. Res.* 68, 12–8.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. J.* 181, 221–231.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Maes, D., Dellagostin, O.A., 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. *Vet. Microbiol.* 165, 234–242.
- Sørensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, a a, Feld, N.C., Friis, N.F., Bille-Hansen, V., Jensen, N.E., Pedersen, M.W., 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet. Microbiol.* 54, 23–34.
- Stakenborg, T., Vicca, J., Butaye, P., Imberechts, H., Peeters, J., De Kruif, A., Haesebrouck, F., Maes, D., 2006a. A Multiplex PCR to Identify Porcine *Mycoplasmas* Present in Broth Cultures. *Vet. Res. Commun.* 30, 239–247.
- Stakenborg, T., Vicca, J., Butaye, P., Maes, D., Peeters, J., Kruif, A. de, Haesebrouck, F., 2005. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 109, 29–36.
- Stakenborg, T., Vicca, J., Maes, D., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2006b. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *J. Microbiol. Methods* 66, 263–275.
- Stark, K.D.C., Nicolet, J., Frey, J., 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by Air Sampling with a Nested PCR Assay. *Appl. Envir. Microbiol.* 64, 543–548.
- Stemke, G.W., Phan, R., Young, T.F., Ross, R.F., 1994. Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, and *M. hyorhinae* on the basis of amplification of a 16S rRNA gene sequence. *Am. J. Vet. Res.* 55, 81–4.

- Stipkovits, L., Miller, D., Glavits, R., Fodor, L., Burch, D., 2001. Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* with various antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 65, 213–22.
- Strait, E.L., Madsen, M.L., Minion, F.C., Christopher-Hennings, J., Dammen, M., Jones, K.R., Thacker, E.L., 2008. Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2491–2498.
- Tacchi, J.L., Raymond, B.B.A., Haynes, P.A., Berry, I.J., Widjaja, M., Bogema, D.R., Woolley, L.K., Jenkins, C., Minion, F.C., Padula, M.P., Djordjevic, S.P., 2016. Post-translational processing targets functionally diverse proteins in *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- Tanner, A.C., Erickson, B.Z., Ross, R.F., 1993. Adaptation of the Sensititre broth microdilution technique to antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 36, 301–6.
- Tavio, M.M., Poveda, C., Assuncao, P., Ramirez, A.S., Poveda, J.B., 2014. In vitro activity of tylvalosin against Spanish field strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Rec.* 175, 539–539.
- Ter Laak, E.A., Pijpers, A., Noordergraaf, J.H., Schoevers, E.C., Verheijden, J.H., 1991. Comparison of methods for in vitro testing of susceptibility of porcine *Mycoplasma* species to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 228–33.
- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R., Thacker, B.J., 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 37, 620–7.
- Thacker, E.L., Minion, F.C., 2012. Mycoplasmosis, in: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (Eds.), *Diseases of Swine*, 10th Edition. Wiley-Blackwell, Ames, pp. 779–797.
- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Boettcher, T.B., Jayappa, H., 1998. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *J. Swine Heal. Prod.* 6, 107–112.
- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Janke, B.H., 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Swine Influenza Virus. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2525–2530.

- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Wolff, T., 2006. Efficacy of a chlortetracycline feed additive in reducing pneumonia and clinical signs induced by experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* challenge. *J. Swine Heal. Prod.* 14, 140–144.
- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Young, T.F., Halbur, P.G., 2000. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 18, 1244–52.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295, 64–6.
- Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., Griem, W., 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91, 271–6.
- Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A.* 226, 153–67.
- Todd, D., Bendinelli, M., Biagini, P., Hino, S., Mamkertz, S., Mishiro, S., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., Ritchie, B., Teo, G., 2005. Circoviridae, in: Fauquet, C., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. (Eds.), *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 327–334.
- Tombácz, K., Patterson, R., Grierson, S.S., Werling, D., 2014. Lack of genetic diversity in newly sequenced porcine circovirus type 1 strains isolated 20 years apart. *Genome Announc.* 2.
- Van Alstine, W.G., Stevenson, G.W., Kanitz, C.L., 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Vet. Microbiol.* 49, 297–303.
- Vasconcelos, A.T.R., Ferreira, H.B., Bizarro, C. V, Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto, P.M., Almeida, D.F., Almeida, L.G.P., Almeida, R., Alves-Filho, L., Assunção, E.N., Azevedo, V.A.C., Bogo, M.R., Brigido, M.M., Brocchi, M., Burity, H.A., Camargo, A.A., Camargo, S.S., Carepo, M.S., Carraro, D.M., de Mattos Cascardo, J.C., Castro, L.A., Cavalcanti, G., Chemale, G., Collevatti, R.G., Cunha, C.W., Dallagiovanna, B., Dambrós, B.P., Dellagostin, O.A., Falcão, C., Fantinatti-Garboggini, F., Felipe, M.S.S., Fiorentin, L., Franco, G.R., Freitas, N.S.A., Frías,

- D., Grangeiro, T.B., Grisard, E.C., Guimarães, C.T., Hungria, M., Jardim, S.N., Krieger, M.A., Laurino, J.P., Lima, L.F.A., Lopes, M.I., Loreto, E.L.S., Madeira, H.M.F., Manfio, G.P., Maranhão, A.Q., Martinkovics, C.T., Medeiros, S.R.B., Moreira, M.A.M., Neiva, M., Ramalho-Neto, C.E., Nicolás, M.F., Oliveira, S.C., Paixão, R.F.C., Pedrosa, F.O., Pena, S.D.J., Pereira, M., Pereira-Ferrari, L., Piffer, I., Pinto, L.S., Potrich, D.P., Salim, A.C.M., Santos, F.R., Schmitt, R., Schneider, M.P.C., Schrank, A., Schrank, I.S., Schuck, A.F., Seuanez, H.N., Silva, D.W., Silva, R., Silva, S.C., Soares, C.M.A., Souza, K.R.L., Souza, R.C., Staats, C.C., Steffens, M.B.R., Teixeira, S.M.R., Urmenyi, T.P., Vainstein, M.H., Zuccherato, L.W., Simpson, A.J.G., Zaha, A., 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J. Bacteriol.* 187, 5568–77.
- Verdin, E., Saillard, C., Labbé, A., Bové, J., Kobisch, M., 2000. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Vet. Microbiol.* 76, 31–40.
- Vicca, J., Maes, D., Stakenborg, T., Butaye, P., Minion, F., Peeters, J., de Kruif, A., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2007. Resistance mechanism against fluoroquinolones in *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Microb. Drug Resist.* 13, 166–70.
- Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., De Kruif, A., Haesebrouck, F., 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet. Microbiol.* 97, 177–190.
- Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., Kruif, D., Haesebrouck, F., Kruif, A. De, 2004. In Vitro Susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Isolates In Vitro Susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 48–51.
- Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M.S., Jaing, C., McLoughlin, K., Gardner, S., Delwart, E.L., 2010. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J. Virol.* 84, 6033–40.
- Villarreal, I., Maes, D., Meyns, T., Gebruers, F., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2009. Infection with a low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolate does not

- protect piglets against subsequent infection with a highly virulent *M. hyopneumoniae* isolate. *Vaccine* 27, 1875–1879.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B.M., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J. Virol.* 77, 13288–300.
- Waites, K.B., Crabb, D.M., Duffy, L.B., Jensen, J.S., Liu, Y., Paukner, S., 2017. In Vitro Activities of Lefamulin and Other Antimicrobial Agents against Macrolide-Susceptible and Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* from the United States, Europe, and China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e02008-16.
- Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H., 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2, *Virus Research*.
- Williams, P.P., 1978. In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* to fifty-one antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14, 210–3.
- Wu, C.C., Shryock, T.R., Lin, T.L., Veenhuizen, and M.F., 1997. Testing antimicrobial susceptibility against *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro. *J. Swine Heal. Prod.* 5, 227–230.
- Xiao, C.-T., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2015. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J. Gen. Virol.* 96, 1830–1841.
- Xiao, C.-T., Harmon, K.M., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2016. PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014–2016. *Vet. Microbiol.* 197, 72–77.
- Xiong, Q., Wei, Y., Xie, H., Feng, Z., Gan, Y., Wang, C., Liu, M., Bai, F., Xie, F., Shao, G., 2014. Effect of different adjuvant formulations on the immunogenicity and protective effect of a live *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine after intramuscular inoculation. *Vaccine* 32, 3445–3451.
- Yazawa, S., Okada, M., Ono, M., Fujii, S., Okuda, Y., Shibata, I., Kida, H., 2004. Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus

- (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 98, 221–228.
- Yu, S., Vincent, A., Opriessnig, T., Carpenter, S., Kitikoon, P., Halbur, P.G., Thacker, E., 2007. Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. *Vet. Microbiol.* 123, 34–42.
- Zhang, Q., Young, T.F., Ross, R.F., Zhang, Q., Young, T.F., 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin . These include : Identification and Characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* Adhesin. *Infect. Immun.* 63, 1013–1019.

8. SITOGRAFIA

<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

<http://kdbio.inesc-id.pt/~csa/index.php>

<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/#ref>

<https://talk.ictvonline.org>

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

<http://www.fao.org/faostat>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<https://www.R-project.org/>

9. RINGRAZIAMENTI

Vorrei esprimere la mia profonda riconoscenza verso il dottor Drigo per avermi coinvolto e supportato in un progetto tanto stimolante, da cui esco gratificato ed arricchito non solo dal punto di vista professionale.

Il ringraziamento più grande non può che andare al dottor Franzo, la cui disponibilità e competenza sono state essenziali, ancor prima che per la stesura di questa tesi, per rendere appagante (auspicabilmente per entrambe le parti) il lavoro quotidiano alla base di essa. Si ringraziano la dottoressa Centelleghes del dipartimento BCA, il dottor Catania dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie e il professor Hause della Kansas State University per il loro contributo allo svolgimento di questo studio.

Rivolgo un sentito grazie al dottor Cecchinato, alla dottoressa Tucciarone ed alla dottoressa Bianco per l'accoglienza, la compagnia, l'aiuto e le possibilità di confronto.

Passando alla dimensione extra-accademica, non posso che sottolineare l'essenzialità del sostegno fornitomi da mia sorella, mio padre e mia madre, senza i quali non avrei potuto affrontare il mio percorso universitario da una posizione altrettanto privilegiata. Spero di aver onorato i vostri sacrifici con qualcosa di ben più concreto di queste parole.

L'ultimo e più affettuoso ringraziamento va a Marta, la quale, oltre ad aver ricoperto il ruolo di correttrice di bozze nonostante fosse evidentemente sovraqualificata, ha contribuito al mio percorso di studio ed alla mia concomitante crescita personale in misura di gran lunga superiore a ciò che sarebbe lecito chiedere anche al più affiatato dei partner.

Questo lavoro è dedicato ad Ettore.