

ASPETTI PRATICI NELLA DIAGNOSI DELLE MALATTIE ASSOCIATE A PCV2

FRANCISCO J. PALLARÉS

*Department of Comparative Anatomy and Pathological Anatomy and Toxicology,
Pathology and Immunology Group (UCO-PIG), UIC Zoonoses and Emerging Diseases
(ENZOEM), Faculty of Veterinary Medicine, Agrifood Campus of International Excellence
(ceiA3), University of Cordoba, Cordoba, Spain.
E-mail: fpallares@uco.es*

Il circovirus suino di tipo 2 (PCV2) è un piccolo virus senza envelope con un genoma circolare a singolo filamento di DNA, appartenente alla famiglia *Circoviridae* e al genere *Circovirus*. Finora sono stati descritti otto genotipi di PCV2 (PCV2a-PCV2h). Il genotipo PCV2d è il più diffuso, seguito da PCV2b e da PCV2a.

Le infezioni da PCV2 possono essere subcliniche e cliniche. In caso di infezioni cliniche, le malattie associate a PCV2 sono indicate come malattie PCV2-associate (PCVAD) e comprendono la malattia sistemica PCV2 (PCV2-SD), la malattia riproduttiva da PCV2 (PCV2-RD), la malattia respiratoria da PCV2 (PCV2-LD), la malattia enterica da PCV2 (PCV2-ED) e la sindrome dermatite-nefrita del suino (PDNS).

Infezione cliniche da PCV2

Malattia sistemica da PCV2 (PCV2-SD)

Per una diagnosi di PCV2-SD devono essere soddisfatti i criteri stabiliti da Sorden (2000) e gli animali affetti devono presentare:

- Segni clinici: ritardo della crescita e deperimento, con ingrossamento dei linfonodi inguinali e frequentemente dispnea, ittero, pallore cutaneo, diarrea o ulcere gastriche
- Lesioni istopatologiche caratteristiche: deplezione linfocitaria con istiociti e infiltrazione di cellule multinucleate giganti nei tessuti linfoidei
- Quantità da moderate ad elevate di PCV2 nelle lesioni: che possono essere valutate mediante immunistochemica (IHC), che rileva l'antigene, o ibridazione in situ (ISH), che rileva l'acido nucleico.

La malattia colpisce tipicamente suini di 2-4 mesi di età, con una morbilità tra il 4-30%, che occasionalmente può raggiungere il 50-60%, e una mortalità del 4-20%.

Per una corretta diagnosi, vanno fatte alcune considerazioni: in primo luogo, i segni clinici non sono diagnostici poiché molte altre patologie possono causare deperimento (es. malattie respiratorie e enteriche, parassiti, ecc.). In secondo luogo, le lesioni macroscopiche non sono diagnostiche, perché l'ingrossamento dei linfonodi può essere associato a diverse condizioni o patologie. E infine, l'infezione da PCV2 non è sinonimo di PCV2-SD perché il PCV2 è ubiquitario e suini sani con tessuti linfoidei istologicamente normali possono presentare un basso numero di cellule PCV2-positive nei follicoli linfoidei.

Poiché è stata osservata una forte correlazione tra quantità di PCV2 e gravità delle lesioni microscopiche, le tecniche di quantificazione come la qPCR (PCR quantitativa) potrebbero essere potenzialmente utilizzate per la diagnosi di malattie associate a PCV2. Infatti, la qPCR è utilizzata nella pratica come metodo indicativo del coinvolgimento clinico del virus. Nei laboratori diagnostici spagnoli, i valori considerati nel siero e nei tessuti sono:

- Siero: $<10^2$ (negativo o non rilevante), $10^2 - 10^4$ (basso o dubbio), $10^4 - 10^8$ (malattia subclinica) e $>10^8$ (alta possibilità di coinvolgimento clinico).
- Tessuti: $<10^9$ (malattia subclinica) e $\geq 10^9$ (alta possibilità di coinvolgimento clinico). Questi valori sono utilizzati anche come riferimento per la diagnosi di altre malattie associate a PCV2.

È importante sottolineare che per la diagnosi individuale i criteri sono la presenza delle lesioni microscopiche caratteristiche, consistenti nella deplezione dei linfociti con istiociti e infiltrazione di cellule giganti multinucleate e la rilevazione di carica virale da moderata ad alta all'interno delle lesioni mediante IHC o ISH. La qPCR può essere utilizzata per la diagnosi, non sul singolo, ma sulla popolazione. Per quanto riguarda l'uso della sierologia, può essere problematico poiché i pattern di sierconversione possono essere abbastanza simili tra aziende colpite e non.

Malattia riproduttiva da PCV2 (PCV2-RD)

Questa malattia è caratterizzata dalla comparsa di aborti tardivi e nati morti, mummificazioni e un aumento del numero di suinetti morti durante la fase di allattamento. Poiché gli embrioni sono suscettibili all'infezione da PCV2, l'azione del virus all'inizio della gestazione indurrà morte embrionale e ritorno in calore. Quando questi ritorni sono associati a infezione da PCV2, saranno seguiti da sierconversione per PCV2 e/o dalla positività alla PCR vicino all'evento. Ci sono discrepanze per quanto riguarda il numero reale di casi di PCV2-RD sul campo e la sua importanza come malattia riproduttiva.

Le lesioni osservate nel feto comprendono ingrossamento e congestione epatica, ipertrofia cardiaca con aree di scolorimento, ascite, idrotorace e idropericardio.

I criteri per la diagnosi di PCV2-RD sono stati stabiliti da Segalés (2012) e sono:

- Aborti tardivi e nati morti, a volte con evidente ipertrofia del cuore del feto
- Presenza di lesioni cardiache caratterizzate da miocardite fibrosante e/o necrotizzante estesa
- Presenza di elevate quantità di PCV2 nelle lesioni miocardiche e in altri tessuti fetali. Per la diagnosi, è consigliabile inviare feti diversi, nati morti o mummificati da scrofe abortite, poiché il virus potrebbe essere presente solo in alcuni di essi al momento del campionamento.

I segni clinici PCV2-RD sono indistinguibili da altre malattie che causano aborti tardivi e nati morti, come il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV) o *Leptospira spp.* In caso di mummificati di diverse dimensioni, dobbiamo differenziare questa malattia dall'infezione da parvovirus suino (PPV).

Malattia respiratoria da PCV2 (PCV2-LD)

Il PCV2 è uno dei principali patogeni primari coinvolti nello sviluppo del Complesso della Malattia Respiratoria Suina (PRDC), causando una polmonite interstiziale grave caratterizzata da insufficienza fino a collasso polmonare, consistenza gommosa e aree di consolidamento screziate distribuite multifocalmente in tutto il parenchima polmonare. Microscopicamente, i polmoni colpiti presentano infiltrazione settale con cellule mononucleate, ipertrofia e iperplasia dei pneumociti di tipo II e aumento dell'essudato bronchiolare e alveolare. Per la diagnosi differenziale, la polmonite interstiziale causata da PCV2 è macroscopicamente e microscopicamente indistinguibile da quella causata da PRRSV, quindi devono essere utilizzate altre tecniche di laboratorio, come IHC, ISH o qPCR, per una corretta diagnosi finale.

La malattia respiratoria di solito colpisce i suini tra le 8 e le 26 settimane di età e i principali segni clinici sono ritardo della crescita e deperimento, febbre, tosse, dispnea e pelo ruvido. Questi segni sono molto simili a quelli osservati in PCV2-SD, e per una corretta diagnosi differenziale dovremo

considerare che in PCV2-SD una delle caratteristiche della malattia è la presenza di lesioni linfoidi sistemiche, un fatto che non si verifica nel PCV2-LD. Per questo motivo, dobbiamo conferire diversi tessuti linfoidi insieme ai polmoni per raggiungere una diagnosi definitiva.

Malattia enterica da PCV2 (PCV2-ED)

PCV2 può causare nei suini in accrescimento-ingrasso una patologia caratterizzata dalla presenza di diarrea con ispessimento della mucosa, in particolare dell'ileo e delle prime sezioni del colon, e linfonodi mesenterici ingrossati. Microscopicamente, la lesione corrisponde a un'enterite granulomatosa e a una deplezione linfocitaria con infiammazione granulomatosa nelle placche di Peyer (ma non in altri tessuti linfoidi), associata alla presenza di PCV2 (antigene o acido nucleico). La lesione è macroscopicamente simile all'adenomatosi intestinale cronica o subacuta (enteropatia proliferativa) causata da *Lawsonia intracellularis*, sebbene in questo caso la lesione microscopica più caratteristica sia la proliferazione di cellule epiteliali immature della cripta che danno origine a cripte iperplastiche e displastiche.

Sindrome dermatite-nefrite del suino (PDNS)

Questa sindrome può colpire suini in svezzamento, magronaggio o ingrasso, con una prevalenza <1% (talvolta superiore), e una mortalità vicina al 100% nei suini di età superiore ai 3 mesi e al 50% negli animali più giovani. La malattia è caratterizzata dalla presenza cutanea di macule e papule irregolari, da rosso a viola, principalmente negli arti posteriori e nella zona perineale, con emorragie sottocutanee ed edema. Nei suini in fase di recupero dalla fase acuta della malattia, si possono osservare cicatrici cutanee. Entrambi i reni appaiono ingranditi con piccole petecchie corticali ed edema della pelvi renale. Altre lesioni osservate sono linfonodi ingrossati e, occasionalmente, infarti della milza.

I criteri per la diagnosi di un caso di PDNS sono (Segalés 2012):

- Lesioni cutanee emorragiche e necrotizzanti (arti posteriori e area perineale) e/o reni ingrossati e pallidi con petecchie corticali generalizzate
- Vasculite necrotizzante sistemica e glomerulonefrite fibrinosa necrotizzante

PCV2 può essere rilevato in casi di PDNS ma, poiché l'antigene scatenante della malattia è ancora sconosciuto, la rilevazione di PCV2 non è un requisito diagnostico.

Per le lesioni cutanee, prenderemo in considerazione una diagnosi differenziale con malattie come erisipela, pitiriasi rosea, setticemia, peste suina africana e classica, sindrome da stress suino (ipertermia maligna) e altri processi patologici che causano eritema transitorio (ristagno di urina sul pavimento, ustioni chimiche, ecc.). Per le lesioni renali, è necessario effettuare una diagnosi differenziale con la peste suina africana e classica e le patologie setticemiche.

Infezione subclinica da PCV2 (PCV2-SI)

Questa è la manifestazione PCV2 più comune poiché l'infezione da virus è ubiquitaria. Non ci sono segni clinici evidenti e talvolta si osserva solo una diminuzione di alcuni parametri produttivi come l'incremento medio giornaliero. Come lesioni microscopiche, si nota, se presente, una lieve deplezione dei linfociti con infiammazione granulomatosa nei tessuti linfoidi, con quantità scarsa o assente di PCV2 (antigene o acido nucleico). I valori di qPCR indicativi di infezioni subcliniche utilizzati come riferimento nei laboratori diagnostici spagnoli sono 10^4 - 10^8 nel siero e $< 10^9$ nei tessuti.

Nuovi circovirus (PCV3 e PCV4)

PCV3 è stato identificato per la prima volta nel 2015-2016 negli Stati Uniti a causa del sequenziamento massiccio effettuato in seguito all'utilizzo della metagenomica. Questo virus è stato associato a malattie riproduttive (aborti, nati morti, nati deboli e mummificati), PDNS,

miocardite (feti e suinetti nati deboli), encefalite (suinetti nati deboli) e periarterite sistemica (suini svezzati). È stato rilevato sia in animali malati che sani e sta circolando nella popolazione suina in modo endemico. La prevalenza delle malattie associate è ancora sconosciuta. Le tecniche diagnostiche per PCV3 come ISH, qPCR e sequenziamento vengono offerte nei laboratori diagnostici in Spagna.

PCV4 è stato scoperto in Cina nel 2019 in suini con sintomi respiratori ed enterici e PDNS. Il significato clinico e la patogenesi di questo virus richiedono ulteriori indagini.

Campionamento per la diagnosi

Un campionamento adeguato è molto importante per raggiungere una diagnosi corretta. Qui di seguito vengono indicati alcuni consigli da considerare quando si raccolgono campioni per la diagnosi di malattie associate a PCV2, ma anche per altre malattie.

Selezione di animali per l'autopsia

Selezionare diversi animali (almeno 2-3) con malattia acuta e segni clinici conclamati, evitando la selezione di animali con malattia cronica. Se i maiali sono morti, selezionare solo animali morti di recente. Se possibile, scegliere maiali non medicati.

Istopatologia

Prelevare campioni il prima possibile, comprendendo tessuti lesionati e non lesionati. La fissazione avviene per immersione dei campioni in formalina tamponata al 10% (può essere preparata utilizzando 1 parte di formalina e 9 parti di acqua di rubinetto). Lo spessore del campione deve essere massimo di 1 cm e la proporzione tessuto:formalina intorno a 1:10. Utilizzare contenitori di plastica con chiusura ermetica e corretta identificazione, non refrigerare il contenitore con i campioni perché può ritardare il processo di fissazione. Importante, i campioni per l'istopatologia non dovrebbero mai essere congelati. Quando possibile, utilizzare un doppio contenitore per evitare perdite e fuoriuscite.

PCR

Utilizzare contenitori o sacchetti di plastica sterili con una corretta identificazione. Questa tecnica può essere eseguita su diversi tipi di campioni: tamponi tissutali, nasali, tracheali o bronchiali, lavaggi broncoalveolari, fluidi orali, feci, ecc. Il congelamento è adatto per i campioni da sottoporre a PCR.

Sierologia

Meglio inviare campioni di siero in provette di plastica (tipo Eppendorf) o da prelievo, correttamente identificati. Il siero può essere congelato, ma non congelare la provetta con il coagulo.

Batteriologia

Utilizzare provette o sacchetti di plastica sterili con una corretta identificazione, refrigerati. I tessuti o i tamponi con terreno di crescita sono campioni adatti per la batteriologia. Se si utilizzano organi cavi inviarli con margini legati e non mescolare campioni di intestino con altri campioni nello stesso contenitore.

IMPORTANTE!!! Quando si inviano campioni diversi per diversi approcci diagnostici, utilizzare contenitori differenti tra loro per evitare la contaminazione incrociata, che potrebbe non rendere validi i risultati ottenuti (come quelli derivati dalla perdita di fuoriuscita di formaldeide).