

RUOLO DEL CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2 (PCV2) E DEL VIRUS DELLA SINDROME RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA DEL SUINO (PRRSV) NEL CONTESTO DEL COMPLESSO DELLE MALATTIE RESPIRATORIE DEL SUINO (PRDC) IN ITALIA

ROLE OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) AND PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) IN PORCINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX (PRDC) IN ITALY

D'ANNUNZIO G.¹, OSTANELLO F.², MUSCATELLO L.V.², ORIOLES M.³, JACUMIN N.⁴, TOMMASINI, N.⁴, LEOTTI G.⁴, LUPPIA.¹, ALBORALI L. G.¹, MANDRIOLI L.², SARLI G.².

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e della Emilia-Romagna*

²*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna*

³*Dipartimento di Scienze agroalimentari, ambientali e animali dell'Università di Udine*

⁴*Boehringer Ingelheim Animal Health Italia SpA*

Parole chiave: istopatologia, PCVD, PRRSV, PRDC

Keywords: histopathology, Porcine Circovirus Disease, Porcine Respiratory Disease Complex

RIASSUNTO

In questa indagine, su 79 casi di *Porcine Respiratory Disease Complex* (PRDC) provenienti da 22 diversi allevamenti del Nord Italia, è stato indagato il ruolo di PCV2 e PRRSV nel determinismo della malattia attraverso lo studio istologico ed immunoistochimico delle lesioni. Il campionamento di polmone, ma anche di tessuti linfoidi (linfonodi inguinale superficiale e tracheo-bronchiale, milza, tonsilla) ed ileo per gli esami istopatologici ai fini della diagnosi delle *Porcine Circovirus Disease* (PCVD) ha consentito, nei casi PCV2+ nel polmone, di concludere per forme sistemiche di malattia (PCV2 *systemic disease* – PCV2-SD) quando i soggetti presentavano lesioni e positività anche nei tessuti linfoidi, seppure la sintomatologia clinica fosse per tutti di tipo respiratorio. Nel 63,6% dei casi positivi a PCV2 a livello polmonare è stata riscontrata anche una deplezione linfoide in almeno uno dei tessuti linfoidi esaminati. Nella casistica esaminata, a fronte di una sintomatologia respiratoria comune a tutti i soggetti, una alta percentuale di casi era in realtà riconducibile a forme sistemiche di malattia da PCV2. Per evitare di sottostimare il danno indotto dal PCV2 in allevamento è necessario condurre un campionamento non limitato al solo polmone per differenziare la forma sistemica di malattia che, viceversa, in assenza di altri segni tipici, potrebbe non essere correttamente individuata. L'infezione da PCV2, insieme a quella da PRRSV, rimangono tra le principali cause di PRDC in Nord Italia, impattando sulla sanità della mandria: in campo le co-infezioni aggravano il quadro patologico, ed il loro controllo necessita la scelta delle misure più appropriate sulla base delle evidenze anatomopatologiche ed analitiche.

ABSTRACT

This study aimed to investigate through histological and immunohistochemical evaluation the pathological role of PCV2 and PRRSV on 79 cases of Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) gathered from 22 farms in Northern Italy. Thanks to appropriate sampling (lung, inguinal and trachea-bronchial lymph nodes, spleen, tonsil and ileum) for circovirus-associated diseases (PCVD) diagnosis, the methods could detect lesions and antigens in lymphoid tissues and in the lung. Results show that 63.6% of PCV2-positive cases had

lymphoid depletion in at least one of the examined lymphoid tissues in addition to pulmonary lesions. Thus, these were consequently classified as PCV2 systemic diseases (PCV2-SD). In this case series, despite the clinical manifestation of respiratory symptoms, a higher percentage of cases were attributable to systemic forms of PCV2 disease. In conclusion, appropriate sampling is crucial in the absence of typical signs to avoid underestimating the damage induced by PCV2 in farms and overlooking the systemic form of the disease. PCV2 and PRRSV remain among the primary infections linked to PRDC in Northern Italy, affecting farm health. Therefore, co-infections can significantly aggravate the pathology in the field, making it necessary to choose appropriate control measures.

INTRODUZIONE

L'espressione "complesso delle malattie respiratorie del suino" (*Porcine Respiratory Disease Complex* – PRDC) descrive l'insieme di forme cliniche di polmoniti causate dall'interazione di fattori eziologici (virali e batterici), ambientali, manageriali e genetici, che provoca significative perdite economiche negli allevamenti intensivi (Opriessnig et al., 2011).

La natura polimicrobica della PRDC complica la diagnosi e il tentativo di determinare quali virus o batteri siano i principali responsabili del problema respiratorio osservato in allevamento. La diagnosi su base clinica è limitata dal fatto che le forme a eziologia virale sono complicate dall'effetto di infezioni batteriche concomitanti o secondarie, e che i segni clinici sono spesso molto simili anche quando virus diversi colpiscono l'apparato respiratorio (Janke, 1995). La complessità delle interazioni tra patogeni rende dunque difficile lo studio della PRDC, la diagnosi eziologica, la prevenzione ed il controllo della malattia (Opriessnig et al., 2011), (Sunaga et al., 2020).

In caso di sospetta PRDC può essere utilizzata un'ampia gamma di test diagnostici diretti o indiretti, i primi per l'individuazione di un patogeno durante l'infezione, i secondi per il monitoraggio nel tempo delle infezioni in un allevamento (Giles et al., 2017). La diagnosi diretta delle infezioni virali viene attualmente eseguita con metodi molecolari come la PCR qualitativa (PCR), la PCR quantitativa (qPCR) o la PCR *multiplex* (Christopher-Hennings et al., 2019; Hernandez-Garcia et al., 2017; Trang et al., 2018, 2014; Lung et al., 2017; Sunaga et al., 2020). Sebbene le metodiche biomolecolari siano altamente sensibili, non permettono di discriminare la semplice infezione dalla malattia (Maes et al., 2014). Inoltre a causa della natura endemica ed ubiquitaria della maggior parte dei patogeni coinvolti nella patologia respiratoria del suino, non sempre l'isolamento/identificazione di un particolare microrganismo è correlato al fatto che questo sia direttamente coinvolto nello sviluppo della malattia e/o associato alle lesioni presenti (Yaeger and Alstine, 2019). In questo contesto, le indagini istopatologiche devono essere considerate come importanti strumenti per assegnare il giusto ruolo agli agenti eziologici individuati: la possibilità di co-localizzare l'agente eziologico con le rispettive lesioni caratteristiche grazie all'impiego di tecniche immunoistochimiche (IHC) o di ibridazione *in situ* (ISH) permette di oggettivare il ruolo svolto dal patogeno nel determinismo della malattia (Sarli et al., 2021).

L'infezione da PCV2 è stata associata a forme respiratorie di malattia e a lesioni polmonari interstiziali di tipo istiocitario/granulomatoso fin dai primi anni della sua scoperta come agente causale della sindrome da deperimento progressivo post-svezzamento (PMWS) (Harms et al., 2002; Kim et al., 2004; Ségales et al., 2004), e successivamente nelle forme di polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) in associazione ad altri agenti virali (Ellis et al., 2004; Grau-Roma and Segalés, 2007; Morandi et al., 2010). Pertanto, la forma respiratoria è stata annoverata tra le *Porcine circovirus diseases* (PCVD) con la nomenclatura di *PCV2-*

associated respiratory disease (Opriessnig et al., 2007) o PCV2 lung disease (PCV2-LD) secondo Segalés, (2012) (Tabella 1).

Tabella 1. Nomenclatura delle malattie associate all'infezione da *Circovirus suino tipo 2*. Confronto della letteratura secondo Opriessnig et al., 2007 e Segalés, 2012.

Table 1. Terminology for porcine circovirus diseases. Literature comparison according to Opriessnig et al., 2007 and Segalés, 2012.

Diseases	Porcine circovirus diseases – PCVD Segalés, 2012	Porcine circovirus associated diseases – PCVAD Opriessnig et al., 2007
Subclinical infection	PCV2 subclinical infection «PCV2-SI»	PCV2-subclinical infection
Posweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)	PCV2 systemic disease «PCV2-SD»	PCV2-systemic infection
Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS)	PCV2-PDNS	PCV2-PDNS
Reproductive failure	PCV2 reproductive disease «PCV2-RD»	PCV2-reproductive failure
PRDC – PNP	PCV2 lung disease «PCV2-LD»	PCV2-associated respiratory disease
Necrotizing lymphadenitis	Necrotizing lymphadenitis	Necrotizing lymphadenitis
Granulomatous enteritis	PCV2 enteric disease «PCV2-ED»	PCV2-enteritis

Tuttavia, sussiste una potenziale sovrapposizione tra la forma esclusivamente respiratoria e la forma sistemica da PCV2, definita come PCV2 *systemic disease* (PCV2-SD) (Segalés, 2012), poiché la sintomatologia respiratoria può essere presente anche nelle forme sistemiche di infezione.

Sebbene, nel tempo, PCV2 si sia riconfermato come importante patogeno coinvolto nella PRDC (Fablet et al 2012; Hansen et al 2010; Paz-Sánchez et al 2021; Wellenberg et al., 2010), si ritiene che la PCV2-LD sia in realtà un'entità trascurabile in allevamento e che la maggior parte dei casi clinicamente diagnosticati come casi di PRDC associati a PCV2, con l'analisi concomitante dei tessuti linfoidi, si configurino invece come forme di PCV2-SD caratterizzate quindi anche da deplezione linfocitaria nei distretti linfoidi dell'organismo (Segalés and Sibila, 2022; Ticó et al., 2013).

È noto che lo sviluppo di PCVD è favorito da co-infezioni di natura virale o batterica che sperimentalmente consentono di riprodurre in maniera più efficiente la malattia, e che sono altresì di frequente riscontro anche in condizioni di campo associate a forme cliniche e a lesioni più gravi (Opriessnig and Halbur, 2012; Ouyang et al., 2019). In particolare, nelle forme cliniche respiratorie è molto comune la co-infezione PCV2/PRRSV (Burgara-Estrella et al., 2012; Drolet et al., 2003; Fan et al., 2013; Harms et al., 2001; Zeng et al., 2014). PRRSV è annoverato tra i patogeni virali primari della PRDC. Insieme a PCV2 i due virus sono responsabili principalmente di un'azione immunosoppressiva sulle cellule del

sistema immunitario che determina un'alterazione delle difese dell'ospite predisponendolo a infezioni secondarie batteriche e virali (Chase and Lunney, 2019; Loving et al., 2015; Lunney et al., 2016; Niederwerder et al., 2016). L'interazione tra i due agenti patogeni nel potenziare le manifestazioni cliniche di malattia evidenzia l'importanza della diagnosi accurata e del controllo dei due virus in allevamento.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di indagare il ruolo di PCV2 in casi di PRDC osservati in 22 allevamenti del Nord Italia. Lo studio è stato condotto sul polmone ma anche su diversi distretti linfoidi dell'organismo per poter stimare quante delle forme respiratorie osservate potevano essere classificate come malattia respiratoria associata a PCV2 o essere viceversa riconducibili a quadri di infezione e malattia sistemica da PCV2. Sulla stessa casistica è stato valutato l'eventuale ruolo di PRRSV (da solo o in associazione con PCV2) nel determinismo delle forme di PRDC esaminate nel corso dello studio.

MATERIALI E METODI

La casistica si compone di 79 suini di oltre 4 settimane di età appartenenti a gruppi di animali con anamnesi di PRDC e provenienti da 22 allevamenti del Nord Italia. I suini erano deceduti a seguito di sintomatologia respiratoria o sacrificati a fini diagnostici. Tutte le aziende incluse prevedevano misure di profilassi vaccinale nei confronti del PCV2 e 4 riportavano problemi clinici correlati a PRRSV. Tutti i suini sono stati sottoposti a necropsopia durante la quale sono stati prelevati e fissati in formalina campioni di tessuto per l'esame istopatologico, tra cui in particolare polmone, tonsilla, linfonodo tracheobronchiale e/o mediastinico, milza, ileo e linfonodo inguinale superficiale come previsto dal campionamento *standard* per le indagini relative alla ricerca di PCV2 nei tessuti.

Istologia ed immunoistochimica

I tessuti fissati in formalina sono stati processati per l'allestimento dei preparati istologici. Le sezioni dei diversi tessuti sono state esaminate per la valutazione qualitativa delle lesioni microscopiche. Nel polmone le lesioni sono state classificate secondo i criteri di Caswell and Williams (2015) come: broncopolmonite, polmonite interstiziale, polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP), pleuropolmonite fibrinosa. Le lesioni sono state registrate come singole o combinate quando sono stati osservati, rispettivamente, uno o più tipi di lesione. Nei tessuti linfoidi, le lesioni sono state classificate in iperplasia linfoide o deplezione linfoide (Valli et al., 2015); il quadro istologico è stato considerato nella norma (NN) in caso di tessuto linfoide normotrofico ed assenza di iperplasia.

Parallelamente alla colorazione con ematossilina eosina, sezioni di 3 µm di spessore degli stessi tessuti esaminati (polmone, tonsilla, linfonodo tracheobronchiale e/o mediastinico, milza, ileo e linfonodo inguinale superficiale), mentre per l'indagine sul PRRSV solo il polmone, sono stati sottoposti ad esame immunoistochimico rispettivamente per PCV2 e PRRSV. I dettagli del protocollo immunoistochimico utilizzato sono riportati in Tabella 2. Come controlli positivi sono state impiegate sezioni di linfonodo e polmone precedentemente individuati come positivi per la presenza degli antigeni di PCV2 e PRRSV.

Tabella 2. *Immunoistochimica (IHC), materiali e metodi.*

Table 2. *Immunohistochemistry (IHC), materials and methods.*

Agente eziologico	Anticorpo primario (tipo e clone)	Fornitore	Diluizione/incubazione	Smascheramento siti antigenici	Sistema di rivelazione
PCV2	mAb 36A9, Isotipo: IgG ₂ a Anti-VP2 PCV2	Ingenasa, Madrid, Spain	1:1500 overnight 4°C	30' in protease XIV 0,05%, pH 7,5, a 37°C	CRF Anti-Polyvalent HRP Polymer - ScyTek Laboratories
PRRSV	1AC7, Isotipo: IgG ₂ a Specifico per proteina N	Ingenasa, Madrid, Spain	1:500 overnight 4°C	30' in protease XIV 0,05%, pH 7,5, a 37°C	CRF Anti-Polyvalent HRP Polymer - ScyTek Laboratories

Nel polmone, la reazione IHC per PCV2 è stata considerata positiva in caso di colorazione granulare marrone del citoplasma dei macrofagi alveolari ma anche dei monociti, delle cellule epiteliali bronchiali, delle cellule endoteliali e delle cellule dendritiche centrofollicolari nei tessuti linfoidi (Opriessnig et al., 2007; Segalés, 2012; Ticó et al., 2013). L'IHC per PRRSV è stata considerata positiva in caso di colorazione marrone nel citoplasma dei macrofagi alveolari, degli pneumociti di tipo II e nelle cellule epiteliali bronchiali (Grau-Roma and Segalés, 2007; Han et al., 2012; Zimmerman et al., 2019).

Criteri diagnostici

I quadri di polmonite associati alla positività nel polmone e/o nei tessuti linfoidi per PCV2 sono stati considerati come PCVD. Partendo dal presupposto che i soggetti inclusi nello studio erano tutti casi con sintomatologia respiratoria e diagnosi clinica di PRDC, secondo gli attuali criteri diagnostici per la definizione di ciascun caso di PCVD (Segalés and Sibilia, 2022), i casi con polmoni positivi per PCV2 e concomitante presenza di deplezione linfocitaria da moderata a grave nei tessuti linfoidi associata ad una quantità da moderata ad elevata del virus nei tessuti linfoidi sono stati considerati indicativi di forma sistemica di malattia da PCV2 (PCV2-SD).

I casi che presentavano polmoni e/o tessuti linfoidi positivi per PCV2 e lesioni istopatologiche minime (iperplasia linfoide) o assenti, sono stati invece considerati come casi di PRDC dove l'infezione da PCV2 ha avuto un ruolo attivo (PRDC/PCV2+), in considerazione dell'indicazione di non considerare più la PCV2-LD tra le PCVD (Segalés and Sibilia, 2022).

RISULTATI

Nei 79 casi di PRDC esaminati la principale lesione polmonare osservata è stata la polmonite interstiziale, con o senza evidenza concomitante di broncopolmonite. In particolare, sono stati osservati: 44 casi (55,7%) di polmonite interstiziale pura (Figura 1A); 17 casi (21,5%) di broncopolmonite (Figura 1B) associata a polmonite interstiziale; 8 casi (10,1%) di polmonite proliferativa e necrotizzate (PNP) (Figura 1C); 2 casi (2,5%) di PNP associata a polmonite interstiziale e concomitante broncopolmonite essudativa; 2 casi (2,5%) di pleuropolmonite fibrinosa; 2 casi di broncopolmonite pura (2,5%); 1 caso di broncopolmonite con concomitante polmonite interstiziale e pleuropolmonite

(1,3%); 2 casi con evidenza di sola congestione ed emorragie polmonari (2,5%); 1 caso di broncopolmonite riconducibile macroscopicamente e microscopicamente a polmonite enzootica (1,3%).

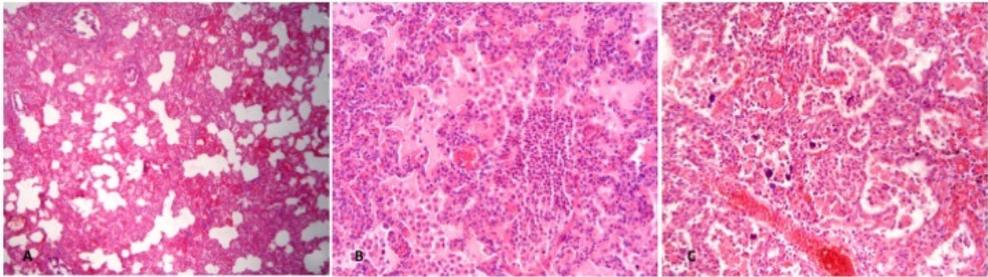


Figura 1. Lesioni polmonari, ematossilina eosina. A) polmonite interstiziale, caso 25057, 63×; B) Broncopolmonite essudativa: essudazione di neutrofilii e macrofagi negli alveoli, caso 25058, 250×; C) Polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP), caso 26104, 250×.
Figure 1. Pulmonary lesion, hematoxylin eosin stain. A) Interstitial pneumonia, case 25057, 63×; B) Bronchopneumonia: alveolar exudation of neutrophils and macrophages, case 25058, 250×; C) Proliferative and necrotizing pneumonia (PNP), case 26104, 160× and 400× respectively.

Dei 79 casi di PRDC, 44 (55,7%) sono risultati positivi all'IHC per PCV2 (nel polmone o in almeno uno dei tessuti linfoidi esaminati) e 34 (43,0%) all'IHC per PRRSV (Figura 2). Nel 20,3% dei casi è stata osservata una positività in IHC per entrambi i virus. In 17 casi (21,5%) nessuno dei due virus è stato rilevato. La Tabella 3 sintetizza i risultati dell'IHC nel contesto di ciascuna lesione polmonare osservata nei casi in esame.

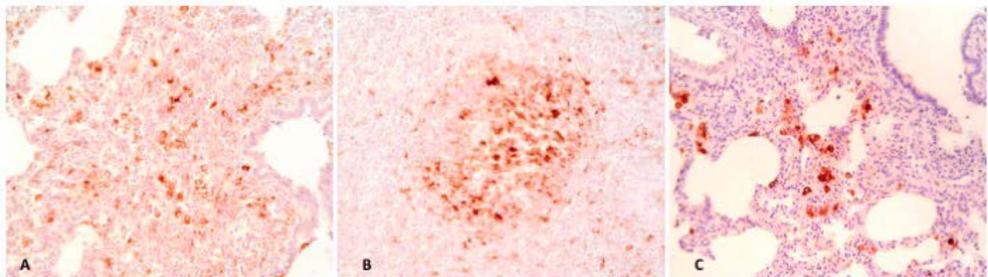


Figura 2. Prova immunoistochimica per PCV2 e PRRSV. A) polmone, macrofagi dell'interstizio positivi per PCV2, caso 26766, 250×; B) linfonodo inguinale superficiale, positività centrollicolare per PCV2, caso 26767, 250×; C) Macrofagi alveolari e pneumociti di tipo II positivi per PRRSV, caso 26768, 250×; C)
Figure 2. PCV2 and PRRSV immunohistochemistry. A) lung, PCV2+ interstitial macrophages, case 26766, 250×; B) inguinal superficial lymph node, centrollicular positivity to PCV2 antigen, case 26767, 250×; PRRSV+ alveolar macrophages and PRRSV+ pneumocytes type II, case 26768, 250×.

Tabella 3. Sintesi dei risultati delle prove immunoistochimiche per PCV2 e PRRSV nel contesto delle lesioni polmonari osservate. *BP, broncopneumonia; IP, polmonite interstiziale; PNP, polmonite proliferativa e necrotizzante; CE, congestione ed emorragia; FPP, pleuropneumonia fibrinosa.

Table 3. Summary of results of PCV2 and PRRSV immunohistochemistry associated with the pulmonary lesions. *BP, bronchopneumonia; IP, interstitial pneumonia; PNP, proliferative and necrotizing pneumonia; CE, congestion and hemorrhage; FPP, fibrinous pleuropneumonia.

Lesione anatomopatologica*	N°casi	IHC PCV2+	IHC PRRSV+	IHC PCV2+ / PRRSV+
BP	1	1	2	1
BP + IP	17	6	3	0
BP + IP + PNP	2	0	2	0
BP + IP + FPP	1	1	0	0
IP	44	28	17	11
CE	2	1	0	0
FPP	2	1	1	1
PNP	8	5	6	3

Nei 10 casi con lesioni polmonari ascrivibili a PNP, 5 sono risultati PCV2- / PRRSV+; 2 PCV2+ / PRRSV- e 3 PCV2+ / PRRSV+

Nei 44 soggetti con tessuti linfoidi positivi all'IHC per PCV2, 28 (63,6%) mostravano lesioni ascrivibili a deplezione linfocitaria (Figura 3A) e/o flogosi granulomatosa (figura 3B) in almeno uno dei tessuti linfoidi esaminati e positività immunoistochimica per PCV2 in almeno uno dei tessuti linfoidi saggiati con IHC. Questi casi sono stati considerati come PCV2-SD. Nei 16 (36%) casi rimanenti, oltre alle lesioni polmonari positive per PCV2 (riscontrate in 13 su 16), si evidenziava un quadro di lieve/moderata iperplasia del tessuto linfoide o tessuti linfoidi normotrofici, associato o meno a lieve positività a PCV2 nelle cellule dendritiche centrofollicolari in almeno una delle stazioni linfoidi. Questi casi sono stati considerati come PRDC/PCV2+.

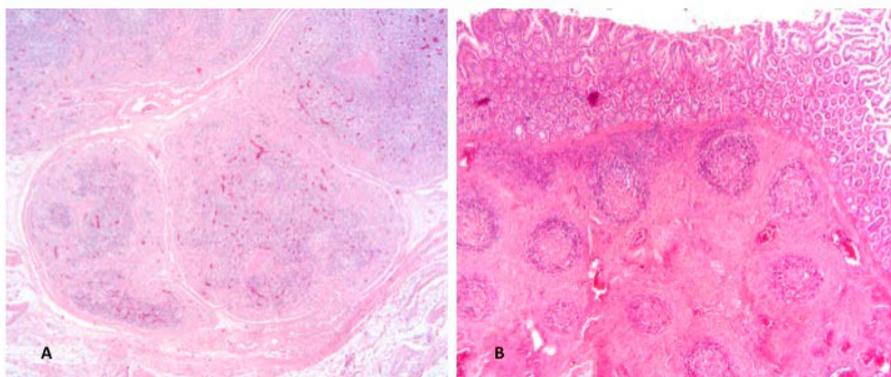


Figura 3. Lesioni nei tessuti linfoidi. A) Linfonodo, deplezione linfoide, caso 26105, 250×; B) Ileo, ileite granulomatosa: granulomi centrofollicolari, caso 26105, 250×.

Figure 3. Lymphoid lesions. A) lymph node, lymphoid depletion, case 26105, 250x; B) ileum, granulomatous ileitis: centrofollicular granulomas, case 26105, 250×.

Poiché la corretta diagnosi di PCVD deve prevedere che l'iter diagnostico venga condotto su un gruppo di 3-5 soggetti, i risultati relativi alla classificazione e definizione dei singoli casi in PCV2-SD e PRDC/PCV2+ sono stati elaborati anche suddividendoli per azienda di provenienza (Figura 4).

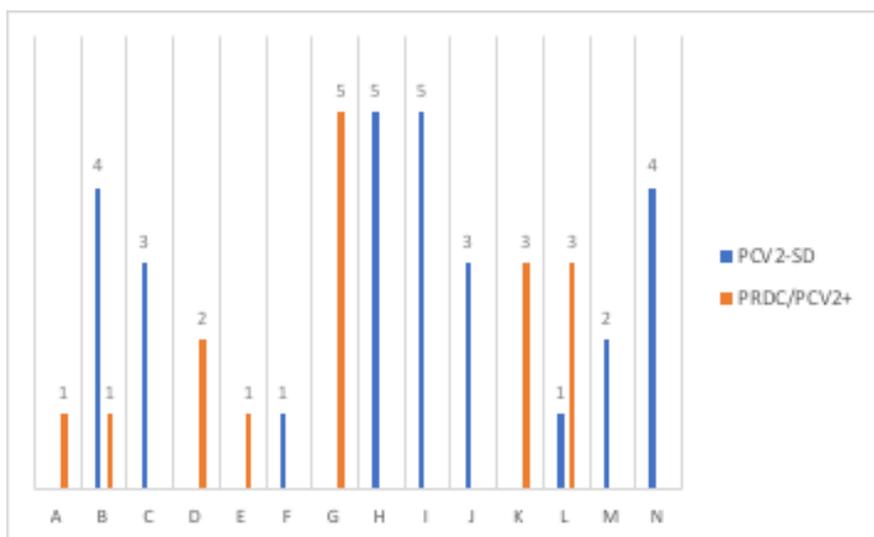


Figura 4. Categorizzazione dei singoli casi PCV2+ suddivisi per azienda di provenienza. A-N azienda di provenienza. In ogni azienda è indicato il numero di soggetti conferiti per l'iter diagnostico, categorizzati, in base ai risultati già riferiti, come portatori di PCVD-SD o di PRDC-PCV2+. Poiché la diagnosi finale è sul gruppo, nelle aziende B ed L la diagnosi finale sarà di PCVD-SD. Si rimanda alla discussione per maggiori dettagli.

Figure 4. Number of PCVD-SD or PRDC-SD cases in each farm. A-N farms. As the final diagnosis is on the flock, in herds B and L the final diagnosis will be PCVD-SD. Refer to the discussion for more details.

Dodici dei 28 casi riconducibili a PCV2-SD (42,9%) sono risultati positivi anche all'IHC per PRRSV nel polmone. Nel 25% dei casi classificati come PRDC/PCV2+ è stata osservata una positività all'IHC per PRRSV (Figura 5).

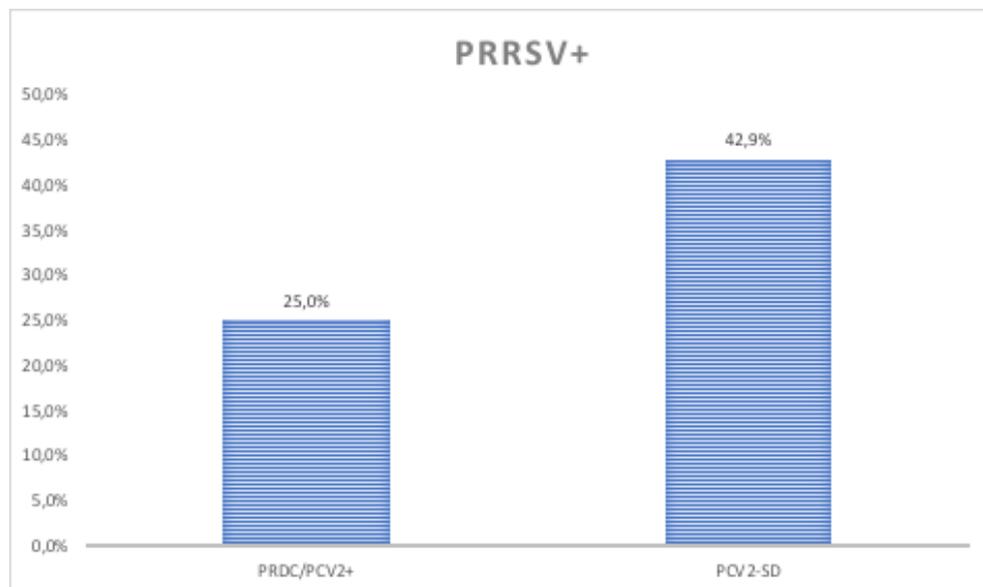


Figura 5. Valori percentuali di positività al PRRSV nel polmone nei casi di PCV2-SD e PRDC/PCV2.
Figure 5. Percentage values of PRRSV positivity in lung in PCV2-SD and PRDC/PCV2 cases.

DISCUSSIONE

La PRDC è una condizione clinica ad elevata morbilità che si manifesta in suini di oltre quattro settimane d'età con sintomatologia respiratoria spesso non responsiva agli antibiotici e che sottende un ampio spettro di lesioni polmonari causate da microrganismi batterici e virali che agiscono in sinergia nel determinare e/o aggravare il danno polmonare.

In questo studio, condotto utilizzando tecniche istologiche, su 79 casi di PRDC, il *pattern* microscopico di polmonite maggiormente osservato è stata la polmonite interstiziale (55,7%), seguita da forme miste in cui, accanto alla lesione di polmonite interstiziale, si osservavano aree di broncopolmonite essudativa (21,5%).

Nel suino il *pattern* interstiziale di polmonite è quello tipicamente correlato ad infezioni virali che raggiungono il polmone per via ematogena (es. PCV2, PRRSV), mentre l'essudazione di neutrofili e macrofagi nel comparto bronchiolo-alveolare è indice di complicazioni batteriche (Sarli et al., 2021). Le lesioni microscopiche polmonari osservate suggeriscono quindi un quadro dovuto principalmente a infezioni virali complicate da infezioni batteriche secondarie e compatibile, quindi, con la definizione di PRDC (Loosli, 1968; Opriessnig et al., 2011).

I risultati dell'IHC per PCV2 e PRRSV hanno confermato l'associazione dell'aspetto microscopico delle lesioni con la causa virale, rilevando la presenza degli antigeni dei due virus nella maggior parte dei casi in esame associati alla polmonite interstiziale (Tabella 3). Sebbene si tratti di patogeni non esclusivamente respiratori, PCV2 e PRRSV si confermano quali virus fortemente coinvolti in forme cliniche respiratorie del suino (Opriessnig et al., 2011). Nel 20,3% dei casi, l'IHC ha evidenziato la co-infezione PCV2/PRRSV nei polmoni.

La co-infezione tra PCV2 e PRRSV è un fenomeno noto (Burgara-Estrella et al., 2012; Drolet et al., 2003; Fan et al., 2013; Harms et al., 2001; Zeng et al., 2014), così come è noto che l'infezione da PRRSV agisca come co-fattore in grado di aggravare le lesioni ed indurre le manifestazioni cliniche di PCVD (Harms et al., 2001; Park et al., 2014).

In accordo con studi precedenti (Drolet et al., 2003; Morandi et al., 2010), i casi di PNP osservati nel presente lavoro erano associati soprattutto ad infezione con PRRSV e presenza dell'antigene virale nel contesto delle lesioni polmonari, con una rilevante percentuale di casi (30%) positivi sia a PCV2 sia a PRRSV.

In questo studio, pur essendo sempre presente il polmone quale organo *target* da esaminare, poiché ci si riferiva ad animali con sintomatologia respiratoria, il campionamento ha previsto sempre anche la raccolta di altri organi, rappresentati da tessuti linfoidi, che sono considerati lo *standard* di riferimento per discriminare tra loro le diverse forme di PCVD. Ciò ha consentito, nei casi in cui è stata rilevata la presenza di PCV2 nel polmone, di pervenire ad una diagnosi di PCV2-SD quando i soggetti presentavano lesioni e positività anche nei tessuti linfoidi. Questo a fronte di una sintomatologia respiratoria comune a tutti i casi esaminati. Infatti, in 28 dei 44 soggetti positivi a PCV2 (63,6%) è stata riscontrata deplezione linfoide in almeno uno dei tessuti linfoidi esaminati (tonsilla, linfonodo tracheobronchiale, linfonodo inguinale superficiale, milza e ileo), in aggiunta alle lesioni polmonari. I criteri diagnostici per la definizione di casi di malattia sistemica da PCV2 stabiliti fin dalle prime descrizioni di malattia associate a PCV2 (Segalés et al., 2005; Segalés, 2012) comprendono la triade composta da segni clinici, lesioni e *viral detection* nel contesto delle lesioni caratteristiche e sono a tutt'oggi valide (Segalés and Sibila, 2022). Nella casistica esaminata, a fronte di una sintomatologia prevalentemente respiratoria in assenza di grave deperimento ed anemia (segni clinici tipicamente associati alla PCV2-SD), una alta percentuale (63,5%) di casi era in realtà riconducibile a forme sistemiche di malattia da PCV2. Questa osservazione è in accordo con quanto rilevato da Ticó et al., (2013) che non riconosce la "*lung disease*" come entità a sé stante ma la inquadra come parte di un più ampio quadro sistemico di infezione. L'epidemiologia di PCV2 ha subito modifiche sostanziali dall'avvento della profilassi vaccinale (Segalés, 2015) e negli anni si è assistito ad una riduzione della gravità della malattia, con un aumento della prevalenza dei segni clinici aspecifici nelle categorie produttive colpite (Kristensen et al., 2015). Sebbene i vaccini-PCV2 siano tra i più efficaci impiegati in allevamento, sono comunque descritti casi di PCV2-SD nelle mandrie vaccinate (Opriessnig et al., 2013; Seo et al., 2014). Questo sarebbe principalmente da imputare all'impiego di protocolli vaccinali inappropriati come vaccinazioni tardive o troppo precoci, con interferenza dell'immunità di derivazione materna (Segalés and Sibila, 2022), piuttosto che alla circolazione di nuovi ceppi in grado di evadere la protezione indotta dalla vaccinazione (Sibila et al., 2021). Inoltre bisogna considerare che l'infezione da PCV2 è un fattore necessario ma non sufficiente nel determinismo delle PCVD e che è necessaria la presenza di altri fattori tra cui le co-infezioni batteriche o virali (Segalés et al., 2019).

Il virus della PRRS è individuato come patogeno chiave coinvolto nelle co-infezioni nell'allevamento suinicolo (Saade et al., 2020; Zhao et al., 2021). In questo studio, 12/28 (42,9%) polmoni di soggetti con diagnosi di PCV2-SD erano positivi anche a PRRSV (Figura 7). Numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che le co-infezioni PCV2-PRRSV possono indurre segni clinici e lesioni più gravi rispetto alle infezioni sostenute dai singoli patogeni (Allan et al., 2000; Rovira et al., 2002). Le co-infezioni virali possono direttamente o indirettamente determinare una maggiore replicazione e virulenza dei virus coinvolti (Fan et al., 2013; Niederwerder et al., 2015; Niederwerder et al., 2016; Sinha et al., 2011) dovute,

nel caso di PRRSV e PCV2, al sinergismo dei due virus nella modulazione dell'immunità innata e adattativa dell'ospite (Dong et al., 2015; Richmond et al., 2015; Tu et al., 2015).

La diagnosi di PCVD è una diagnosi di mandria (Segalés et al., 2019). Considerando la provenienza dei campioni esaminati ed elaborando i dati ottenuti per singola azienda positiva per PCV2 (14/22) (Figura 8), in 7 aziende tutti i suini esaminati presentavano il quadro diagnostico riconducibile a PCV2-SD. In 5 aziende, tutte le forme osservate erano riferibili a PRDC/PCV2+, sebbene da 2 aziende fosse stato conferito solo 1 soggetto e da una solo 2, condizione che potrebbe essere considerata insufficiente per una diagnosi attendibile sulla mandria in funzione dell'eterogeneità fra gli animali. Infatti, in 2 aziende, si è registrata discordanza dei risultati tra i singoli casi esaminati ma, l'evidenza di forma sistemica di malattia su almeno un soggetto tra quelli esaminati depone per la conclusione diagnostica di PCV2-SD sul gruppo.

In questo studio i singoli casi di PRDC diversi da PCV2-SD ma con coinvolgimento di PCV2 (PRDC/PCV2+), erano quelli in cui non si osservavano le lesioni caratteristiche di deplezione linfocitaria nei tessuti linfoidi (16/44, 36,4%). Tuttavia tutti sono risultati positivi a PCV2 a livello polmonare e/o in almeno uno dei distretti linfoidi esaminati, in presenza di lesioni polmonari (fatta eccezione che in tre casi in cui il polmone era negativo a PCV2). Se, in condizioni sperimentali, è raro osservare lesioni polmonari microscopiche con la sola infezione da PCV2 (Hoogland et al., 2006; Opriessnig et al., 2006), in condizioni di campo numerosi co-fattori, infettivi e non, possono concorrere a potenziare il danno polmonare. Alla luce della correlazione positiva tra carica virale PCV2 nel siero e nei tessuti (Grau-Roma et al., 2009) si presume che in soggetti infetti anche in maniera subclinica ed in assenza di deplezione linfoide, il virus partecipi al determinismo della PRDC.

Anche quando non è diagnosticata la forma sistemica di malattia da PCV2 ma si ha l'evidenza di circolazione virale e di presenza dell'antigene nei tessuti, l'infezione ha conseguenze negative sulla sanità della mandria e sulle performances produttive. Nella casistica esaminata, PCV2 è risultato associato in alta percentuale a sintomatologia respiratoria anche in assenza di forma sistemica di malattia. In questi casi, quando è possibile escludere una causa batterica specifica per lo sviluppo di PRDC, l'evidenza di infezione da PCV2 deve costituire un campanello d'allarme per la situazione sanitaria in azienda e guidare il miglioramento delle strategie di controllo e profilassi in allevamento.

CONCLUSIONI

Nei casi di PRDC esaminati in questo studio è stato osservato che PCV2 gioca un ruolo a vario titolo, potendone rilevare la presenza nel polmone in associazione a lesioni microscopiche di polmonite interstiziale. In molti casi, forme cliniche di patologia respiratoria sottendono lesioni non solo polmonari ma anche di deplezione linfoide in diversi distretti linfoidi dell'organismo associate alla presenza di PCV2; questa osservazione permette di indirizzare la diagnosi verso la forma sistemica di PCVD (PCV2-SD). Per evitare di sottostimare il danno indotto da PCV2 è quindi necessario condurre un campionamento appropriato per differenziare la forma sistemica di malattia che, viceversa, in assenza di altri segni tipici, potrebbe non essere correttamente individuata. Sebbene sia superata la definizione di PCV2-LD (Segalés and Sibila, 2022), PCV2 rimane tra i principali patogeni responsabili di PRDC, insieme al PRRSV. In campo le co-infezioni possono aggravare il quadro patologico, imponendone il controllo scegliendo le misure più appropriate sulla base delle evidenze patologiche ed analitiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Allan, G. M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S. (2000). Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch. Virol.* 145, 2421–2429.
2. Burgara-Estrella, A., Montalvo-Corral, M., Bolaños, A., Ramírez-Mendoza, H., Valenzuela, O., Hernández, J. (2012). Naturally co-infected boars with both porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 532–538.
3. Caswell, J. L., Williams, K.J. (2015). Respiratory System, in: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Volume 2, Elsevier. 465-591.
4. Chase, C. & Lunney, J. K. (2019). Immune System. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J., *Diseases of Swine*, Wiley, 264–291.
5. Christopher-Hennings, J., Erickson, G.A., Hesse, R.A., Nelson, E.A., Rossow, S., Scaria, J., Slavic, D. (2019). Diagnostic Tests, Test Performance, and Considerations for Interpretation. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J., *Diseases of Swine*, Wiley, 75–97.
6. Dong, V. H., Tu, P. Y., Tsai, P. C., Lin, Y. H., Chang, H. L., Kuo, T. Y., Chiou, M. T., Lin, C. N., Chung, W. B. (2015). Expression of Toll-like receptor signaling-related genes in pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Res. Vet. Sci.* 101, 180–186.
7. Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, B., Magar, R. (2003). Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet. Pathol.* 40, 143–148.
8. Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan, G. M. (2004). Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet. Microbiol.* 98, 159-163.
9. Fablet, C., Marois-Créhan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N. (2012). Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. *Vet. Microbiol.* 157, 152–163.
10. Fan, P., Wei, Y., Guo, L., Wu, H., Huang, L., Liu, J., Liu, C. (2013). Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Virol. J.* 10, 265.
11. Giles, T.A., Belkhiri, A., Barrow, P.A., Foster, N. (2017). Molecular approaches to the diagnosis and monitoring of production diseases in pigs. *Res. Vet. Sci.* 114, 266–272.
12. Grau-Roma, L., & Segalés, J. (2007). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet. Microbiol.* 119(2-4), 144–151.
13. Grau-Roma, L., Hjulsager, C. K., Sibila, M., Kristensen, C. S., López-Soria, S., Enøe, C., Casal, J., Bøtner, A., Nofrarias, M., Bille-Hansen, W., Fraile, L. (2009). Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet. Microbiol.* 135, 272-282.
14. Han, K., Seo, H. W., Oh, Y., Kang, I., Park, C., Kang, S. H., Kim, S. H., Lee, B. H., Kwon, B., Chae, C. (2012). Evaluation of monoclonal antibody-based immunohistochemistry for the detection of European and North American Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and a comparison with in situ hybridization and reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 719–724.

15. 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.
16. Harms, P. A., Halbur, P. G., Sorden, S. D. (2002). Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J. Swine Health Prod.* 10, 27–30.
17. Harms, P. A., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Bolin, S. R., Lager, K. M., Morozov, I., Paul, P. S. (2001). Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 38, 528–539.
18. Hernandez-Garcia, J., Robben, N., Magnée, D., Eley, T., Dennis, I., Kayes, S.M., Thomson, J.R., Tucker, A.W. (2017). The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porc. Health Manag.* 3, 7.
19. Hoogland, M. J., Opriessnig, T., Halbur, P. G. (2006). Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. *J. Swine Health Prod.* 14, 133–139.
20. Janke, B.H. (1995). Diagnosis of viral respiratory disease in swine. *J. Swine Health Prod.* 3, 116–120.
21. Kim, J., Chung, H. K., Chae, C. (2003). Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet. J.* 166, 251–256.
22. Kristensen, C. S., Hjulsgaard, C. K., Larsen, L. E. (2015). A two-year follow-up study of the PCV2 status of a Danish pig herd that was initially assumed to be PCV2-free. *Porc. Health Manag.* 1, 5.
23. Loosli, C.G. (1968). Synergism between respiratory viruses and bacteria. *Yale J. Biol. Med.* 40, 522–540.
24. Loving, C. L., Osorio, F. A., Murtaugh, M. P., Zuckermann, F. A. (2015). Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 167, 1–14.
25. Lung, O., Ohene-Adjei, S., Buchanan, C., Joseph, T., King, R., Erickson, A., Detmer, S., Ambagala, A. (2017). Multiplex PCR and Microarray for Detection of Swine Respiratory Pathogens. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 834–848.
26. Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., Renukaradhya, G. J. (2016). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 4, 129–154.
27. Maes, R.K., Langohr, I.M., Wise, A.G., Smedley, R.C., Thaiwong, T., Kiupel, M. (2014). Beyond H&E. *Vet. Pathol.* 51, 238–256.
28. Meredith, M. J. (1992). Review of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. Pig Disease And Information Centre.
29. Morandi, F., Ostanello, F., Fusaro, L., Bacci, B., Nigrelli, A., Alborali, L., Dottori, M., Vezzoli, F., Barigazzi, G., Fiorentini, L., Sala, V. (2010). Immunohistochemical detection of aetiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in Italian pigs. *J. Comp. Pathol.* 142, 74–78.
30. Niederwerder, M. C., Bawa, B., Serão, N. V., Tribble, B. R., Kerrigan, M. A., Lunney, J. K., Dekkers, J. C., Rowland, R. R. (2015). Vaccination with a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Modified Live Virus Vaccine Followed by Challenge with PRRS Virus and Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Protects against PRRS but Enhances PCV2 Replication and Pathogenesis Compared to Results for Nonvaccinated Cochallenged Controls. *Clin. Vaccine Immunol.* 22, 1244–1254.
31. Niederwerder, M. C., Jaing, C. J., Thissen, J. B., Cino-Ozuna, A. G., McLoughlin, K. S., Rowland, R. R. (2016). Microbiome associations in pigs with the best and worst clinical

- outcomes following co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet. Microbiol.* 188, 1–11.
32. Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L.G., Halbur, P.G. (2011). Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim. Health Res. Rev. / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 12, 133–148.
 33. Opriessnig, T., Halbur, P. G. (2012). Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res.* 164, 20–32.
 34. 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, 149-154.
 35. 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. Diagn. Invest.* 19, 591–615.
 36. Opriessnig, T., Xiao, C. T., Gerber, P. F., Halbur, P. G. (2013). Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet. Microbiol.* 163, 177–183.
 37. Ouyang, T., Zhang, X., Liu, X., Ren, L. (2019). Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses. *Viruses* 11, 185.
 38. Park, C., Seo, H. W., Park, S. J., Han, K., Chae, C. (2014). Comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated lesions produced by co-infection between two genotypes of PCV2 and two genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 95, 2486–2494.
 39. Paz-Sánchez, Y., Herráez, P., Quesada-Canales, Ó., Poveda, C. G., Díaz-Delgado, J., Quintana-Montesdeoca, M. D. P., Plamenova Stefanova, E., Andrada, M. (2021). Assessment of Lung Disease in Finishing Pigs at Slaughter: Pulmonary Lesions and Implications on Productivity Parameters. *Animals* 11, 3604.
 40. Richmond, O., Cecere, T. E., Erdogan, E., Meng, X. J., Piñeyro, P., Subramaniam, S., Todd, S. M., LeRoith, T. (2015). The PD-L1/CD86 ratio is increased in dendritic cells co-infected with porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and the PD-L1/PD-1 axis is associated with anergy, apoptosis, and the induction of regulatory T-cells in porcine lymphocytes. *Vet. Microbiol.* 180, 223–229.
 41. Rovira, A., Balasch, M., Segalés, J., García, L., Plana-Durán, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M. (2002). Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.* 76, 3232–3239.
 42. Saade, G., Deblanc, C., Bougon, J., Marois-Créhan, C., Fablet, C., Auray, G., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., Gagnon, C. A., Zhu, J., Gottschalk, M., Summerfield, A., Simon, G., Bertho, N., Meurens, F. (2020). Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Vet. Res.* 51, 80.
 43. Sarli, G., D’Annunzio, G., Gobbo, F., Benazzi, C., Ostanello, F. (2021). The role of pathology in the diagnosis of swine respiratory disease. *Vet. Sci.* 8, 256.
 44. Segalés J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164, 10–19.
 45. Segalés J. (2015). Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Rev. Vaccines* 14, 473–487.
 46. Segalés, J., & Sibila, M. (2022). Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. *Vet. Sci.* 9, 110.
 47. Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 119-142.

48. Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M. (2019). Circoviruses. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J., *Diseases of Swine*, Wiley, 473–487.
49. Segalés, J., Rosell, C., Domingo, M. (2004). Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet. Microbiol.* 98, 137–149.
50. Seo, H. W., Park, C., Kang, I., Choi, K., Jeong, J., Park, S. J., Chae, C. (2014). Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Arch. Virol.* 159, 3107–3111.
51. Sibila, M., Rocco, C., Franzo, G., Huerta, E., Domingo, M., Núñez, J. I., Segalés, J. (2021). Genotyping of Porcine Circovirus 2 (PCV-2) in Vaccinated Pigs Suffering from PCV-2-Systemic Disease between 2009 and 2020 in Spain. *Pathogens* 10, 1016.
52. Sinha, A., Shen, H. G., Schalk, S., Beach, N. M., Huang, Y. W., Meng, X. J., Halbur, P. G., Opriessnig, T. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. *Vet. Microbiol.* 152, 235–246.
53. Sunaga, F., Tsuchiaka, S., Kishimoto, M., Aoki, H., Kakinoki, M., Kure, K., Okumura, H., Okumura, M., Okumura, A., Nagai, M., Omatsu, T., Mizutani, T. (2020). Development of a one-run real-time pcr detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases. *J. Vet. Med. Sci.* 82, 217–223.
54. Ticó, G., Segalés, J., Martínez, J. (2013). The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. *Vet. Microbiol.* 163, 242–247.
55. Trang, N.T., Hirai, T., Yamamoto, T., Matsuda, M., Okumura, N., Giang, N.T.H., Lan, N.T., Yamaguchi, R. (2014). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid from naturally infected pigs in a breeding herd. *J. Vet. Sci.* 15, 361–367.
56. Trang, N.T., Ngan, P.H., Hop, N. Van, Hirai, T. (2018). Nasal Swab – a New Tool for the Detection of Porcine Respiratory Disease Complex in Natural Infected Pigs. *Acta Sci. Microbiol.* 1, 2–5.
57. Tu, P. Y., Tsai, P. C., Lin, Y. H., Liu, P. C., Chang, H. L., Kuo, T. Y., Chung, W. B. (2015). Expression profile of Toll-like receptor mRNA in pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Res. Vet. Sci.* 98, 134–141.
58. Valli, V. E. O. (Ted), Kiupel, M., Bienzle, D., (with Wood, R. D.), (2015). Hematopoietic System, in: Jubb, Kennedy & Palmer’s *Pathology of Domestic Animals*, Volume 3. Elsevier, 102-2068.
59. Wellenberg, G. J., Bouwkamp, F. T., Wolf, P. J., Swart, W. A., Mombarg, M. J., & de Gee, A. L. (2010). A study on the severity and relevance of porcine circovirus type 2 infections in Dutch fattening pigs with respiratory diseases. *Vet. Microbiol.* 142, 217–224.
60. Yaeger, M.J., Alstine, W.G. (2019). Respiratory System. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J., *Diseases of Swine*, Wiley, 393–407.
61. Zeng, Z., Liu, Z., Wang, W., Tang, D., Liang, H., Liu, Z. (2014). Establishment and application of a multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of six viruses in swine. *J. Virol. Methods* 208, 102–106.
62. Zhao, D., Yang, B., Yuan, X., Shen, C., Zhang, D., Shi, X., Zhang, T., Cui, H., Yang, J., Chen, X., Hao, Y., Zheng, H., Zhang, K., Liu, X. (2021). Advanced Research in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Co-infection With Other Pathogens in Swine. *Front. Vet. Sci.* 8, 699561.
63. Zimmerman, J. J., Dee, S. A., Holtkamp, D. J., Murtaugh, M. P., Stadejek, T., Stevenson, G. W., Torremorell, M., Yang, H., Zhang, J. (2019). Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (porcine arteriviruses). In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zhang J., *Diseases of Swine*, Wiley, 685–708.