

PERCORSO DIAGNOSTICO PRE E POST VACCINAZIONE PER PCV2 IN UN ALLEVAMENTO CON PCVAD/PMWS SUBCLINICA

DIAGNOSTIC APPROACH BEFORE AND AFTER VACCINATION FOR PCV2 IN A SUBCLINICAL PCVAD/PMWS HERD

LUPPI A.¹, BONILAUDI P.¹, MAZZONI C.³, SPAGGIARI B.¹,
MAIOLI G.¹, LEONELLI R.¹, DI LECCE R.², BORRI E.³, TONON F.³,
GRADELLINI S.³, FERRARI E.⁴, DOTTORI M.¹

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.
Sezione di Reggio Emilia*

² *Università degli studi di Parma, Facoltà di Medicina Veterinaria*
³ *Libero professionista*

⁴ *AUSL Modena – Distretto di Carpi*

Parole Chiave: PCV2, PCVAD, PMWS, vaccinazione

Key Words: PCV2, PCVAD, PMWS, vaccination

Riassunto. L'applicazione di un percorso diagnostico basato sull'impiego della citologia linfonodale e della real time PCR sul siero e sui linfonodi di suini, prima dell'impiego della vaccinazione per PCV2, può essere d'aiuto alla comprensione dell'incidenza della PCVAD (*Porcine Circovirus Associated Diseases*) e delle infezioni sub-cliniche. L'applicazione del percorso diagnostico in tre momenti diversi e cioè alla comparsa di problemi sanitari riconducibili a PCVAD/PMWS, 5 mesi dopo e successivamente alla vaccinazione, ha permesso di evidenziare nelle fasi pre-vaccinazione, elevati titoli virali sierici e linfonodali tramite Real Time PCR in animali di 12 settimane di vita, non sempre accompagnati da una diagnosi cito-istologica di PCVAD/PMWS. In seguito a vaccinazione, sui campioni di sangue di animali di 5, 12 e 19 settimane di vita, vaccinati a 3 settimane dalla nascita, la Real Time PCR non ha evidenziato la presenza di animali viremici (Real Time PCR negative). Tuttavia, sia i risultati della vaccinazione, sia quelli ottenuti dall'impiego del percorso diagnostico necessitano di ulteriori approfondimenti.

Abstract. A field study was conducted to investigate the use of a diagnostic approach, based on lymph-nodal cytology and sera and lymph-nodal Real Time PCR on pigs, after and before the vaccination against PCV2. This approach can help the understanding of PCVAD (*Porcine Circovirus Associated Disease*) and sub-clinical PCV2 infection herds severity. The diagnostic approach was performed in three different periods, on the set up of health problems, due to PCVAD/PMWS, five months later and after the vaccination. This study showed high sera and lymph-nodal Real Time PCR viral load in 12 weeks old pigs, not always with a confirmatory diagnosis of PCVAD/PMWS, before the vaccination in the herds. 3 weeks old pigs vaccinated didn't show viremia at 5, 12 and 19 of age. The vaccination and the diagnostic approach results need of further investigations.

PREMESSE

Nel 1996 una nuova malattia chiamata “*Post-weaning multisystemic wasting syndrome*” (PMWS) venne descritta in Canada e il *Porcine circovirus type 2* (PCV2) è stato identificato come l’agente causale di questa sindrome. Questa colpisce prevalentemente animali di 5-15 settimane d’età e la sintomatologia clinica include l’aumento della mortalità, deperimento, linfadenomegalia generalizzata, sintomatologia respiratoria ed occasionalmente pallore della carcassa, ittero e diarrea. La diagnosi richiede, oltre alla presenza dei sintomi sopraccitati, la dimostrazione delle classiche lesioni istologiche soprattutto a livello dei tessuti linfoidi e del PCV2 a livello delle lesioni stesse (12).

Un criterio alternativo per arrivare alla diagnosi è la determinazione delle particelle virali a livello del siero ematico attraverso l’impiego della Real Time PCR, in associazione alla presenza dei caratteristici sintomi clinici. In tal modo, animali con infezione sub-clinica avrebbero meno di 10^6 copie di DNA di PCV2/ml di siero, mentre, suini affetti da PMWS presenterebbero un numero di copie superiore a 10^6 , potendo raggiungere livelli di viremia con 10^{12} copie di DNA di PCV2/ml di siero (1, 4, 5, 11).

Per il controllo della malattia, che dimostra avere un notevole impatto economico sulla suinicoltura mondiale, sono stati fatti numerosi sforzi sia intervenendo sui presunti fattori predisponenti (stress, confezioni, ecc.), sia attraverso la produzione di un presidio vaccinale efficace. Questo ha portato alla produzione di vaccini basati sull’induzione di una risposta immunitaria nei confronti dell’open reading frame 2 (ORF2), codificante per la proteina capsidica del PCV2, identificata come l’antigene virale dotato di maggior potere immunogeno in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva.

L’impiego di questi vaccini ha dimostrato una buona efficacia nel ridurre le perdite associate a casi clinici di PCVAD/PMWS, tuttavia la presenza della viremia da PCV2, senza evidenza di PCVAD/PMWS clinica, ha dimostrato avere comunque un impatto negativo sulle performance produttive e sulle perdite totali (mortalità e scarti) in allevamento (2).

Il presente lavoro presenta l’applicazione di un protocollo diagnostico basato sulla valutazione e gradazione delle lesioni linfonodali tramite esame citologico (6,7,12) e sulla contemporanea determinazione quantitativa della presenza del PCV2 in siero e linfonodi in animali di diversa età, pre e post vaccinazione.

MATERIALI E METODI

Allevamento

Allevamento a ciclo chiuso di circa 170 scrofe, collocato nella pianura padana, a gestione tipicamente familiare. La genetica era aziendale, la rimonta interna e come verro terminale veniva impiegato un Duroc Italiano. Dopo lo svezzamento, effettuato a circa 32 giorni d’età, i suinetti erano collocati in un unico ambiente, suddiviso in gabbiette rialzate da circa 10 soggetti l’una. Dopo tre settimane di permanenza in tali strutture, i suinetti venivano trasferiti in un reparto a terra in box multipli da circa 40 capi. L’azienda non segue un rigido “pig flow” così come un rigoroso vuoto sanitario. Dopo circa 10-12 settimane di permanenza in questi reparti, i magroni venivano spostati nel reparto di ingrasso, dove vi rimanevano fino ad un peso di 160-170kg, quando venivano inviati allo stabilimento di macellazione.

La sintomatologia clinica era caratterizzata da forte dimagrimento, disoressia, pallore, respiro accelerato, enterite, atassia locomotoria e refrattarietà ai più diversi trattamenti antibiotici e

faceva la sua comparsa attorno alla quarta settimana dopo lo spostamento a terra, quindi a circa 12 settimane di vita. La mortalità non era molto marcata, ma l'incidenza di scarti stava assumendo, con il passare del tempo, connotati sempre più preoccupanti. In ogni caso si registravano circa un 6-7% di perdite totali (foto 1).



Foto 1: Box contenente animali deperiti e sottopeso
Picture 1: Box with wasted and low body weight animals

Percorso diagnostico (fase preliminare)

Nel mese di Aprile 2008, in seguito al persistere dei problemi sanitari sopraccitati e delle scarse performance produttive si è proceduto all'impiego di un percorso diagnostico basato sul prelievo di sangue da 19 animali (5 animali di 5 settimane, 5 animali di 12 settimane, con sintomatologia clinica PMWS compatibile, 5 animali di 12 settimane e 4 animali di 19 settimane d'età) (Tabella 1).

Tabella 1: Categorie di animali sottoposte alla fase preliminare dello studio.
Table 1: Descriptive data of animals used in the preliminary phase of the study.

Gruppo	Età	Sintomatologia	Es. citologico su linfonodi
A (5 suini)	5 settimane	Nessuna	No
B (5 suini)	12 settimane	PMWS compatibile	Si
C (5 suini)	12 settimane	Nessuna	No
D (4 suini)	19 settimane	Nessuna	No

Dai campioni di sangue è stata eseguita la ricerca di PCV2 tramite Real Time PCR. I 5 soggetti di 12 settimane, classificati come "clinici", sono stati sacrificati ed i relativi linfonodi inguinali sono stati prelevati per l'esecuzione di indagini citologiche per impronta, nell'intento di verificare la presenza di quadri citologici compatibili con una diagnosi di PMWS.

Approfondimento diagnostico

Cinque mesi dopo dal primo prelievo è stato eseguito un ulteriore campionamento di 10

animali di 12 settimane d'età (5 asintomatici e 5 con sintomatologia clinica compatibile con una diagnosi di PMWS), sui quali è stato eseguito un prelievo di sangue per la ricerca e la quantificazione di PCV2 tramite Real Time PCR. I 5 animali "clinici" sono stati sacrificati ed i linfonodi inguinali prelevati, per l'esecuzione di indagini citologiche ed istologiche, oltre alla determinazione quantitativa di PCV2, tramite Real Time PCR. Dai rimanenti 5 soggetti asintomatici è stato asportato per via chirurgica e previa anestesia, un linfonodo inguinale per capo, impiegando la medesima procedura (protocollo anestesiológico, via d'accesso) prevista per la riduzione chirurgica delle ernie inguinali (9, 10).

Protocollo vaccinale

A Settembre 2008, in seguito al persistere dei problemi sanitari sopraccitati, i suinetti di 3 settimane d'età sono stati sottoposti a profilassi vaccinale tramite un'unica somministrazione di un vaccino del commercio che impiega l'inserzione dell'ORF2 in Baculovirus.

Post vaccinazione è stato eseguito un prelievo di sangue da 15 animali in soggetti di 5, 12 e 19 settimane di vita per l'esecuzione della ricerca di PCV2 tramite Real Time PCR. Successivamente all'applicazione della profilassi vaccinale si è proceduto alla valutazione della percentuale di perdite totali (mortalità e scarti).

Esame citologico

I preparati citologici sono stati allestiti tramite impronta di una sezione linfonodale, essiccati all'aria e colorati tramite l'impiego del May Grunwald Giemsa. La sezione del linfonodo, utilizzata per l'allestimento di preparati citologici per impronta, è sempre stata attuata cercando di ottenere una superficie linfonodale relativamente estesa ed, in tal modo, una popolazione cellulare la più rappresentativa possibile.

La porzione linfonodale impiegata per l'esecuzione dell'impronta per l'esame citologico è stata successivamente fissata in formalina tamponata al 10% per l'esecuzione di indagini istologiche, mentre l'emissione rimanente è stata congelata a -20°C, per essere impiegata nella indagine virologica per PCV2 tramite Real Time PCR.

Esame istologico

E' stato applicato soltanto sui campioni linfonodali raccolti durante i campionamenti di approfondimento diagnostico. I campioni di linfonodi inguinali, successivamente alla fissazione in formalina, sono stati sottoposti ad inclusione in paraffina ed impiegati per la realizzazione di sezioni di 5 µm successivamente colorate con ematossilina-eosina ed osservate al microscopio ottico.

Real-time PCR

Per l'esecuzione della PCR quantitativa è stato seguito il metodo indicato da Olvera et al. (2004). I primer impiegati vengono riportati nella tabella seguente (Tabella 2).

Tabella 2. Sequenza, localizzazione e proprietà dei primer e della sonda disegnati per la Real Time PCR del PCV-2 (Olvera A. et al., 2004).

Table 2. Sequence, localisation and properties of primers and probe designed for the PCV-2 Real Time PCR (Olvera A. et al., 2004).

Oligo	Tm (°C)	% CG	bp	Sequenze (5'→3')	Localizzazione nel genoma del PCV2
PCV2 F	60	63	19	CCAGGAGGGCGTTGTGACT	1535→1553
PCV2R	59	55	20	CGCTACCGTTGGAGAAGGAA	1633→1614
PCV2S	68	52	25	AATGGCATCTTCAACACCCGCCTCT	1612→1592

RISULTATI

I risultati dell'indagine virologica della fase preliminare, condotta tramite Real Time PCR, sono riassunti in tabella 3, dove vengono riportati anche i dati relativi alla diagnosi citologica. I soggetti appartenenti al gruppo B hanno evidenziato un numero di copie virali di DNA di PCVII a livello del siero mediamente maggiore di 1,4 log rispetto a quello dei soggetti del gruppo C. Inoltre, andando a confrontare il risultato della PCR quantitativa tra i quattro gruppi, è possibile osservare che passando dal gruppo B al gruppo D il titolo medio virale cala progressivamente. Nel gruppo A (animali di 5 settimane di età) non è stata osservata presenza di viremia. L'esame citologico dei linfonodi inguinali dei soggetti appartenenti al gruppo B ha evidenziato su tre animali, quadri compatibili con una diagnosi di PMWS, caratterizzati da sensibile diminuzione dei linfociti, a favore di una popolazione di cellule macrofagico-istiocitarie. In due casi le impronte linfonodali hanno mostrato una popolazione cellulare caratterizzata prevalentemente da piccoli linfociti, senza quadri compatibili con una diagnosi di PMWS.

Tabella 3: Risultati della PCR quantitativa e dell'esame citologico nei quattro gruppi di suini sottoposti allo studio (fase preliminare).

Table 3: Parameters of viremia and lymph-nodal cytology results of four groups of pigs submitted to the study (preliminary phase).

Gruppo	Età	Real Time PCR log (copie di ac. nucleico virale)/ml	Diagnosi Citologica
A	5 settimane	0	-
	5 settimane	0	-
	5 settimane	0	-
	5 settimane	0	-
	5 settimane	0	-
B	12 settimane	7.5	PMWS
	12 settimane	5.6	N
	12 settimane	5.9	N
	12 settimane	9.0	PMWS
	12 settimane	8.3	PMWS
C	12 settimane	5.9	-
	12 settimane	5.8	-
	12 settimane	6.8	-
	12 settimane	6.1	-
	12 settimane	4.7	-
D	19 settimane	0	-
	19 settimane	5.1	-
	19 settimane	5.1	-
	19 settimane	0	-

Legenda: N= negativo per PMWS

I risultati dell'approfondimento diagnostico sono riassunti nella tabella 4. Dai risultati della Real Time PCR appare evidente come non esistano sostanziali differenze tra i diversi animali testati. All'esame citologico quattro campioni presentavano elevata ipocellularità (NC), tuttavia la presenza significativa di cellule macrofagocitocitarie è stata osservata solo nel campione n°3 (P) (tabella 4). La diagnosi di PMWS è stata confermata in questo campione, mentre, in tutti gli altri casi, classificati come non conclusivi all'esame citologico, non erano presenti quadri compatibili con la sindrome in esame. Tuttavia, anche nel campione n°3, la lesione linfonodale era caratterizzata da moderata deplezione linfocitaria ed infiltrazione di cellule macrofagocitocitarie, con architettura linfonodale conservata, così come la presenza dei follicoli linfatici.

Tabella 4: Risultati della PCR quantitativa, dell'esame citologico e dell'istologia nel secondo gruppo di suini campionati

Table 4: Real time PCR, cytology and histology results in the second groups of pigs sampled.

Gruppo	N°	Peso degli animali al momento del prelievo (KG)	Real Time PCR log (copie di ac. nucleico virale)/ml/gr		Citologia Linfonodale	Istologia Linfonodale
			Siero	Linfonodi		
Clinica PMWS compatibile	1	24	5.1	7.6	NC	N
	2	12	7.0	5.9	NC	N
	3	12	6.2	7.8	P	P
	4	16	6.9	7.6	N	N
	5	18	6.1	8.0	N	N
Non clinici	1	33	5.0	6.3	N	N
	2	36	8.2	7.6	NC	N
	3	45	4.4	4.9	N	N
	4	42	5.4	7.9	N	N
	5	33	5.4	7.1	NC	N

Legenda: P=PMWS; N=Negativo per PMWS; NC=Non conclusivo

Infine, la ricerca di PCV2 tramite Real Time PCR sui campioni di sangue di animali di 5, 12 e 19 settimane di vita, vaccinati a 3 settimane dalla nascita, non ha evidenziato la presenza di animali viremici (Real Time PCR negative). Gli animali sottoposti a vaccinazione hanno presentato un miglioramento generalizzato, non quantificabile, delle prestazioni zootecniche. In particolare l'incidenza dei morti e degli scarti è passata al 3-4%, così com'è stato possibile ridurre considerevolmente i costi legati alle medicazioni nei mangimi delle prime fasi, senza ripercussioni negative sulla salute degli animali.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Il presente lavoro riporta la preliminare applicazione di un percorso diagnostico per la valutazione dell'impatto dell'infezione da PCV2 in un allevamento con prevalente PCVAD/PMWS subclinica, passando dalla valutazione delle lesioni microscopiche linfonodali e dalla determinazione del titolo virale sia a livello sierico sia a livello linfonodale. Dai risultati riportati in tabella 3 appare evidente come animali fino a 5 settimane siano virologicamente negativi, protetti dall'immunità passiva materna da una attiva ed efficace replicazione virale. L'immunità materna decresce tra le 3 e 8 settimane di vita (3), pertanto non stupisce che animali di 12 settimane siano viremici anche ad alto titolo, come osservato nella fase preliminare del percorso diagnostico. Tra i soggetti considerati con sintomatologia clinica compatibile con PMWS, in 3 su 5 è stata confermata la diagnosi tramite l'impiego di metodi morfologici. Questi soggetti presentavano anche titoli virali nel siero superiori a 10^7 copie virali / ml.

Nel corso dell'approfondimento diagnostico, successivo, avvenuto a distanza di 5 mesi (risultati in tabella 4) solo in un caso dei cinque considerati con sintomatologia clinica compatibile è stata confermata la diagnosi di PMWS. Questo soggetto presentava titoli virali non distinguibili dai restanti animali, in cui la diagnosi di PMWS non è stata confermata.

Dopo la vaccinazione, negli animali prelevati a 5, 12 e 19 settimane di vita, la viremia per PCV2 non è stata dimostrabile tramite Real Time PCR.

Quindi l'applicazione del percorso diagnostico proposto in questo studio ha premesso di ottenere in prima istanza una diagnosi compatibile con PMWS in 3 soggetti di 12 settimane di età, ma ad un ulteriore esame eseguito a distanza di 5 mesi questa diagnosi è stata confermata soltanto in un soggetto e soltanto tramite esame citologico confermato dall'esame istologico. La PCR quantitativa in questo caso non ha premesso di rilevare differenze significative tra questo soggetto e i rimanenti soggetti prelevati. Anzi, in questi ultimi, un soggetto "non clinico" ha presentato un elevato titolo virale ($> 10^7$ copie / ml) sia sierico sia linfonodale, in assenza di reperti microscopici tipici della sindrome. D'altro canto la polifattorialità e la complessità di questa sindrome sono concetti sempre più diffusi. Non bisogna comunque sottovalutare il ruolo che la viremia prolungata da PCV2, può avere tanto sul sistema immunitario quanto sul metabolismo dell'animale. Inoltre è bene ricordare la contemporanea presenza di altre forme virali che si sovrappongono in questa giovane fascia d'età. Peraltro tali situazioni hanno per lunghi anni confuso, e spesso ancora oggi lo fanno, la corretta diagnosi di questa sindrome.

Dopo l'applicazione del protocollo vaccinale, si è osservata la negatività alla PCR in soggetti di 5, 12 e 19 settimane vita testimoniando una assenza di viremia rilevabile.

Da quanto si può evincere dai risultati del percorso diagnostico applicato all'allevamento in studio prima della vaccinazione, questo presentava una diffusa positività in PCR per PCV2, con titoli virali anche molto elevati e con quadri microscopici linfonodali compatibili con PMWS soltanto in alcuni soggetti. Le perdite osservate si attestavano intorno al 6-7%. Una situazione come quella descritta propende per un allevamento con sintomatologia causata da PCV2 di media gravità e/o con una

PCVAD/PMWS sub-clinica.

In questo allevamento la vaccinazione ha migliorato le performance produttive diminuendo le perdite (3-4%) e ha permesso di ottenere soggetti con viremia assente o non più rilevabile tramite PCR. Le osservazioni eseguite nell'allevamento oggetto dello studio troverebbero conferma in precedenti lavori che descrivono l'influenza negativa esercitata dalla viremia da PCV2 anche in assenza della forma clinica, sia sulle performance produttive, sia sulla mortalità in allevamento (2).

In conclusione, alla luce dei dati precedentemente riportati, anche la sola riduzione del titolo virale e della durata della viremia, permette di osservare sensibili miglioramenti dei parametri sanitari, con conseguente vantaggio economico per l'azienda (2).

Tuttavia i risultati ottenuti con la vaccinazione e dalla applicazione del percorso diagnostico devono assolutamente ritenersi di tipo preliminare e necessitano di ulteriori approfondimenti, attraverso l'applicazione di un disegno sperimentale che preveda l'impiego contemporaneo di animali vaccinati e non allevati nelle stesse condizioni ambientali e temporali.

Bibliografia

1. Brumborg I.M., Moldal T., Jonassen C.M. Quantitation of Porcine Circovirus Type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J. Virol. Methods* 2004; 122 (2) :171-178.
2. Fachinger V., Bischoff R., Jedidia B.S., Saalmuller A., Elbers k. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* (2008); 26:1488-1499.
3. Fort A., Sibila M., Allepuz A., Mateu E., Roerink F., Segalés J. Porcine Circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 2008; 26:1063-1071.
4. Krakovka S., Ellis J., McNeilly F., Waldner C., Alla G. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *J. Vet. Diagn Invest* 2005; 17:213-222
5. Liu Q., Wang L., Wilson P., Babiuk L.A. Quantitative, competitive PCR analysis of Porcine Circovirus DNA in in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 2006;8:133-136.
6. Luppi A. Imprint cytological examination in PMWS diagnosis. *Veterinary Record* (2003); 152, (5), 148.
7. Luppi A., Bonilauri P., Di Lecce R., Paoletti F., Bosetti M., Cordioli P. Clinical and pathological investigation in an outbreak of PMWS and diagnostic methods comparison. P. 49; Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June 2008.
8. Luppi A., Merialdi G., Bonilauri P., Dottori M., Cantoni A.M., Cabassi E., Corradi A. (2004). "Grading cito-istologico delle lesioni linfonodali in corso di PMWS nel suino", Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, XXX Meeting Annuale, Salsomaggiore Terme, Parma, Italia, 25-26 Marzo 2004, p.477-485.

9. Mazzone C., Gradellini S. Esperienze di anestesia nel suino in condizioni di campo. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, XXX Meeting Annuale, Salsomaggiore Terme, Parma, Italia, 25-26 Marzo 2004, p.237-243.
10. Mazzone C., Gradellini S., Tono F. Tecnica di riduzione chirurgica dell'ernia inguinale nel suino. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, XXXI Meeting Annuale, Mantova, Italia, 17-18 Marzo 2005, p.429-435.
11. Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Segalés J., Domingo M. Comparison of Porcine Circovirus Type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J. Virol. Methods* (2004); 117 (1):75-80.
12. Sarli G., Mandrioli L., Laurenti M., Sidoli L., Cerati C., Rolla G., Marcato P.S. (2001). "Immunohistochemical characterization of the lymph nodes reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)", *Veterinary Immunology and Immunopathology* 83, p.53-67.