

**DIAGNOSI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO DI SWINEPOXVIRUS,  
AGENTE DI MALATTIA CUTANEA SPORADICA, DURANTE IL PERIODO  
2002-2008 NEL NORD ITALIA**

***ELECTRONMICROSCOPIC DIAGNOSIS OF SWINEPOXVIRUS,  
AETIOLOGICAL AGENT OF SPORADIC SKIN DISEASE DURING THE  
PERIOD 2002-2008 IN NORTHERN ITALY***

**CRISTIANA TITTARELLI, ENRICA SOZZI, BRUNELLA SPAGGIARI,  
G. LORIS ALBORALI, PAOLO CORDIOLI, ANTONIO LAVAZZA**

***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia  
e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini",  
via Bianchi 7/9, 25124, Brescia, Italy***

**Parole chiave:** swinepoxvirus, microscopia elettronica, diagnosi differenziale

**Key words:** swinepoxvirus, electron microscopy, differential diagnosis

**Riassunto.** Durante il periodo 2002-2008, un totale di 44 campioni di cute appartenenti a suinetti o feti provenienti dalla sezione diagnostica di Brescia o dalle Sezioni Diagnostiche provinciali dell'IZSLER di Lombardia ed Emilia Romagna, sono stati esaminati presso il Laboratorio di Microscopia Elettronica. Dei 44 casi esaminati soltanto in 5, pari a 11,3%, è stata emessa diagnosi di vaiolo, confermando la sporadicità della patologia. Di questi, 3 casi erano rappresentati da suinetti lattanti o in svezzamento e 2 erano costituiti da feti. La microscopia elettronica si è dimostrata uno strumento rapido ed efficace.

**Abstract.** During the period 2002-2008, 44 skin samples were performed in northern Italy by electron microscopy (EM). In 5 (11.3%) cases a diagnosis of swinepoxvirus was ascertained, confirming that the disease is sporadic. Of these, 3 cases were piglets or weaning pigs, 2 were fetuses. Negative staining EM is a useful tool for diagnosis of poxvirus infection in pigs.

## **INTRODUZIONE**

SWP virus (SWPV) è l'unico membro del genere *Suipoxvirus* all'interno della famiglia Poxviridae (Moyer, 2000). Esso è responsabile del vaiolo suino, una patologia cosmopolita a decorso acuto, lieve o subclinico, associata di solito a condizioni igienico-sanitarie scadenti. Pur infettando suini di tutte le età, i soggetti giovani (fino a 3 mesi di età) risultano più sensibili, mentre gli adulti generalmente sviluppano una forma lieve, auto-limitante della malattia. I pidocchi (*Haematopinus suis*) sono considerati agenti primari della trasmissione, ma occasionalmente è stata segnalata anche la trasmissione orizzontale in seguito al contatto delle secrezioni orali e nasali con soluzioni di continuo della cute (Delhon *et al.* 2006). L'infezione congenita, conseguente al passaggio del virus per via transplacentare, è stata riportata per la prima volta da Borst *et al.* (1990). Più recentemente Mazzoni *et al.* (2002) e Moorkamp *et al.* (2008) hanno descritto un episodio di vaiolo suino congenito, rispettivamente in Italia e

Germania. In tutti e tre i casi la trasmissione verticale del virus esitava nella nascita di uno-due suinetti per covata con efflorescenze distribuite sull'intera superficie cutanea.

Il genoma del SWPV è costituito da una molecola di DNA a doppia elica costituita da 146 paia di kilobasi che sembrano contenere 150 geni. Nonostante sia geneticamente correlato ad altri membri di Poxvirus (capripoxvirus, leporipoxvirus, yatapoxvirus), SWPV rappresenta un genere distinto (Afonso *et al.*, 2002), in grado di infettare solo il suino. SWPV richiede diversi passaggi in colture cellulari di origine suina prima di indurre effetto citopatico (CPE), mentre i tentativi di isolare il virus in colture di origine diversa dal suino o sulla membrana corion-allantoidea di uova embrionate sono falliti, confermando la specificità d'ospite (Delhon *et al.* 2006).

La diagnosi di sospetto può essere formulata sulla base dell'osservazione delle tipiche lesioni cutanee diffuse su tutta la superficie del corpo, con una lieve predominanza per i padiglioni auricolari, l'addome e la faccia interna delle cosce. Nonostante le perdite economiche conseguenti alla patologia siano poco rilevanti, un buon sistema diagnostico di conferma, comprendente la microscopia elettronica, l'esame istologico o le tecniche di biologia molecolare, sono essenziali per escludere altre diagnosi differenziali, tra cui vanno incluse malattie vescicolari, lesioni cutanee di origine allergica, eritemi solari, dermatiti batteriche, tricotofitosi e parassitosi cutanee (*Tyroglyphus* spp, rogna sarcoptica) (Blood and Radostis, 1989; Yager and Scott, 1985).

Scopo di questo lavoro è quello di raccogliere i casi di sospetto vaiolo nel periodo dal 2002 al 2008 nel Nord Italia e di confermare il sospetto clinico con l'ausilio della microscopia elettronica.

## MATERIALI E METODI

### *Campioni*

Durante il periodo 2002-2008, un totale di 44 campioni di cute appartenenti a suinetti o feti che presentavano lesioni potenzialmente riferibili a vaiolo (Figura 1), provenienti dalla sezione diagnostica di Brescia o dalle Sezioni Diagnostiche provinciali dell'IZSLER di Lombardia ed Emilia Romagna, sono stati esaminati presso il Laboratorio di Microscopia Elettronica (Tabella 1). I campioni, prelevati in singolo o suddivisi in *pool* in sede di esame anatomo-patologico, sono stati immediatamente congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  e successivamente sottoposti ad indagine ultramicroscopica come descritto di seguito.

### *Esame elettron-microscopico*

L'esame al ME in colorazione negativa è stato eseguito con il metodo "della goccia" (Gibbs *et al.*, 1980). Porzioni di cute, sede di lesioni, sono state stemperate in soluzione salina tampinata (PBS) e omogenate in un mortaio. Griglie in rame rivestite in Formvar sono state poste a flottare per 10 minuti su una goccia di estratto in esame, colorate negativamente con una soluzione al 2% del sale sodico dell'acido fosfotungstico (NaPt), PH 6,8, ed esaminate con un TEM Philips CM10, operante a 80 KV, ad ingrandimenti compresi tra 15500 e 28500X.

### *Isolamento virale*

Gli omogenati di porzioni di cute sede di lesioni del caso positivo n° 5 sono stati inoculati su colture primarie di rene suino e su linea cellulare continua PK-15. Le colture cellulari inoculate sono state incubate in termostato a  $37^{\circ}\text{C}$  con atmosfera contenente il 5% di  $\text{CO}_2$  e osservate quotidianamente per verificare lo sviluppo di effetto citopatico. Dopo 6 giorni

d'incubazione, in assenza di manifestazione di effetto citopatico, sono state sottoposte a congelamento e scongelamento e il criolisato nuovamente inoculato su colture cellulari di recente allestimento. I campioni sono considerati negativi dopo 3 passaggi seriali senza comparsa di effetto citopatico.

## RISULTATI

Come indicato in tabella 1, dei 44 casi esaminati soltanto in 5, pari a 11,3%, è stata emessa diagnosi di vaiolo, confermando la sporadicità della patologia. Di questi, tre casi erano rappresentati da suinetti lattanti o in svezzamento e due erano costituiti da feti (Tabella 2). In tutti e cinque i casi riportati era stato formulato un sospetto di vaiolo sulla base dell'esame anatomo-patologico (Tabella 3). Gli allevamenti di provenienza erano tutti a ciclo aperto, tranne uno, con consistenze variabili da 300 a 700 scrofe.

L'esame al microscopio elettronico in colorazione negativa ha permesso di osservare, in tutti i campioni esaminati, numerose particelle virali riferibili per morfologia a poxvirus (Figura 2). In tutti i casi è stato eseguito l'esame batteriologico (Tabella 3) e in un caso è stata segnalata un'infezione batterica da *Staphylococcus aureus*. Nei due casi riportati di natimortalità, sono stati fatti inoltre accertamenti diagnostici per escludere la presenza dei più comuni virus abortigeni (parvovirus, malattia di Aujeszky, PRRS) con esito sempre negativo.

**Tabella 1. Risultati degli esami al ME su campioni di cute durante il periodo 2002-2008**

*Table 1. Results of EM on skin samples during the period 2002-2008*

Anno	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Totale
Totale esami	11	3	6	10	4	4	6	44
Negativi	N°	10	3	4	9	4	4	39
	%	90.9	0.0	66.7	90.0	0.0	0.0	83.3
Positivi	N°	1	0	2	1	0	0	5
	%	9.1	0.0	33.3	10.0	0.0	0.0	16.7

**Tabella 2. Campioni conferiti suddivisi per anno, numero di campioni, età, tipologia di allevamento e provenienza**

*Table 2. Samples divided for year, number of samples, age, type of farming and geographical origin*

Caso	Anno	N°campioni	Età	Tipologia di allevamento	N°scrofe	Provenienza
1	2002	4	Feto	Ciclo aperto	400	Brescia
2	2004	9	Feto	Ciclo aperto	700	Brescia
3	2004	6	Suinetti	Ciclo aperto	400	Rovigo
4	2005	1	Svezzamento	Ciclo chiuso	400	Brescia
5	2008	1	Lattante	Ciclo aperto	300	Modena



**Figura 1. Lesioni riferibili a Poxvirus sulla cute di un suinetto con infezione naturale (caso clinico N° 4)**

*Figure 1. Swine pox lesions on the skin of natural infected pig (clinical case N°4).*



**Figura 2. Immagine al ME in colorazione negativa di particelle virali riferibili a Poxvirus (bar: 200 nm).**

*Figure 2. Negative staining of swine pox virus particles (bar: 200 nm)*

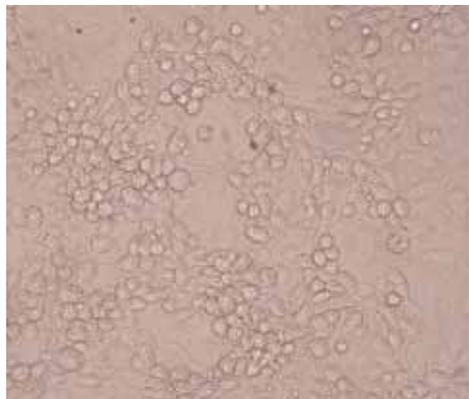
**Tabella 3. Risultati dell'esame anatomo-patologico, batteriologico e virologico eseguiti sui campioni positivi per poxvirus**

*Table 3. Results of necropsy, bacteriologic and virologic exams performed on positive samples*

Caso clinico	Es. anatomo-patologico	Es. Batteriologico	Es. virologico	Ab Parvovirus	Malattia di Aujeszky		PRRS		PCV2		
					Ab gB	IF	Ab	Pcr	Pcr	IF	Elisa
1	Lesioni cutanee vescicolari e collaretti epidermici che lasciano profonde erosioni	neg	n.e.	neg	neg	n.e*	neg	neg	pos	pos	neg
2	Lesioni papulo-vescicolari cutanee diffuse su tutto il corpo	neg	n.e.	neg	neg	n.e	neg	neg	n.e	n.e	n.e
3	Papule crostose in vari distretti cutanei spt. regione addominale	neg	n.e.	n.e.	n.e	n.e	n.e	Peuropeo	n.e	n.e	n.e
4	Lesioni crostose tondeggianti focali diffuse a tutto il corpo	Staph.aureus	n.e.	n.e.	1/256	neg	n.e	Peuropeo	neg	neg	n.e
5	Esantema papuloso diffuso a tutta la superficie cutanea e alla mucosa orale	neg	pos.	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e

\*n.e: non eseguito, not performed

L'esame virologico su colture cellulari inoculate con omogenato di cute positivo per poxvirus del caso n°5 ha consentito l'isolamento virale. In particolare la presenza di effetto citopatico è stata rilevata sia su cellule primarie di rene suino sia su linea continua di PK-15 (Figg. 3 e 4). L'identificazione virale è stata confermata tramite esame al microscopio elettronico in colorazione negativa.



**Figura 3. SWPV: effetto citopatico su PK15 a 5 gg p.i.**

*Figure 3. Swine pox virus: CPE on PK15 cells at 5 days p.i.*



**Figura 4. SWPV: effetto citopatico su RS a 3 gg p.i.**

*Figure 4. Swine pox virus: CPE on primary porcine kidney cells at 3 days p.i.*

## DISCUSSIONE

Questo lavoro confermerebbe la sporadicità della patologia che, pur comportando ridotte perdite economiche va comunque sempre tenuta in debita considerazione, oltre che la sua tendenza a colpire animali in giovane età.

La diagnosi su base clinica della forma cutanea risulta piuttosto agevole, sulla base delle tipiche lesioni cutanee (Figura 1). Tuttavia la natura e la distribuzione delle lesioni possono essere influenzate da infezioni batteriche secondarie, complicando in questo caso la diagnosi. In particolare il vaiolo, nella sua forma cutanea, va posto in diagnosi differenziale con forme di epidermite essudativa da *Staphylococcus hyicus*, malattie vescicolari (afta, malattia vescicolare), mal rosso, mentre nella forma congenita, che esita in natimortalità e mortalità neonatale, va differenziato da patologie abortigene, quali infezioni da parvovirus, malattia di Aujeszky, *porcine reproductive and respiratory syndrome* (PRRS).

Visto il ridotto impatto economico della patologia, non è stato prodotto alcun vaccino, e il controllo della malattia si basa principalmente sul controllo nell'ingresso di animali portatori e sul mantenimento di buone condizioni igienico-sanitarie, compreso il controllo degli ectoparassiti.

La scarsa numerosità campionaria ma anche la sporadicità dei casi osservati non consente di fare considerazioni su come la tipologia di allevamento possa influenzare la comparsa della patologia e neanche di valutare l'eventuale relazione epidemiologica tra gli allevamenti in esame.

## CONCLUSIONI

I dati raccolti in questo studio sono indicativi di una bassa incidenza della patologia, probabilmente a seguito di un miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie in allevamenti con un buon livello organizzativo e manageriale. Si ritiene tuttavia che la patologia potrebbe anche essere sottostimata in quanto, visto il ridotto impatto economico, i campioni spesso non verrebbero conferiti al laboratorio per un approfondimento diagnostico. Per quanto riguarda la valutazione del metodo di indagine utilizzato, la microscopia elettronica si è dimostrata uno strumento rapido ed efficace, considerato anche l'elevato titolo virale presente nelle lesioni cutanee. Inoltre, la recente disponibilità della sequenza genomica del SWPV (Afonso, 2002) permetterebbe lo sviluppo di tecniche molecolari altrettanto rapide, sensibili e specifiche che consentirebbero anche di confrontare la sequenza dei ceppi italiani isolati fino ad ora con quelli americani per valutare eventuali differenze e variabilità genomica del poxvirus suino.

**RINGRAZIAMENTI:** si ringraziano la Sig.ra Michela Fazio e i Sigg. Giuseppe Bertocchi e Giovanni Bozzoni per il supporto tecnico e fotografico.

## Bibliografia

1. Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Osorio FA, Balinsky C, Kutish GF, Rock DL (2002). The genome of swinepox virus *J Virol* 76:783-790.
2. Blood DC, Radostits OM (1989). *Veterinary Medicine: A textbook of the disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses* (7<sup>th</sup> edition). Bailliere Tindall, London. Pp 571-958.
3. Borst GH, Kimman TG, Gielkens AL, van der Kamp JS (1990). Four sporadic cases of congenital swinepox. *Vet Rec* 127:61-63.
4. Delhon G, Tulman ER, Afonso CL, Rock DL (2006). Swine Pox in : Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ "Diseases of swine". 9<sup>th</sup> ed., Ames, Iowa, Blackwell Publishing, 483-487.
5. Gibbs EPJ, Smale CJ, Voyle CA (1980). Electron microscopy as an aid to the rapid diagnosis of virus diseases of veterinary importance. *Vet Rec.* 106, 451-458.
6. Mazzoni C, Gherpelli M, Dottori M, Merialdi G, Gelmetti D, Lavazza A (2002). Descrizione di un episodio di vaiolo suino congenito. *Atti della società italiana di patologia ed allevamento dei suini. XXVIII Meeting annuale, Piacenza, 303-307.*
7. Moorkamp L, Beineke A, Kaim U, Diesterbeck U, Urstadt S, Czerny CP, Ruberg H, Grosse Beilage E. (2008). Swinepox-skin disease with sporadic occurrence. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2008 Apr; 115(4): 162-6.
8. Moyer RW, Arif B, Black DN, Boyle DB, Buller RM, Dumbell KR, Esposito JJ, McFadden G, Moss B, Mercer AA, Ropp S, Tripathy DN, Upton C. (2000). Family Poxviridae. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. MHV van Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, Eb Carstens, MH Estes, SM Lemon, J Maniloff, MA Mayo, DJ McGeoch, CR Pringle, RB Wickner, eds. San Diego: Academic Press, pp. 137-157.
9. Yager JA, Scott DW (1985). The skin and appendages. In *KVF Jubb, PC Kennedy, N Palmer, eds. Pathology of Domestic Animals* (3rd edition), Volume 1. Orlando: Academic Press, pp 407-549.