

ANALISI DI INDICATORI DI EFFICACIA DELLA VACCINAZIONE VERSO PCV2 NEI SUINETTI.

ANALYSIS OF EFFICACY PARAMETERS IN PCV2 VACCINATED PIGS

TERRENI M.¹, VISCHI O.¹, MARTELLI P.²

¹Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica

²Dipartimento di Salute Animale – Università degli Studi di Parma

Parole chiave: PCV2, vaccinazione, beneficio

Key words: PCV2, vaccination, benefit

Riassunto: la malattia da PCV2 è oggi considerata una delle principali malattie del suino in tutto il mondo. Nell'ambito della PCVD si riconoscono forme acute, riconducibili alla PMWS, e forme moderate o lievi. Questo studio ha inteso individuare i fattori che sono stati modificati dopo vaccinazione con Ingelvac CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica) dei suinetti, in allevamenti che presentavano forme cliniche differenti di PCVD. Sono stati esaminati i risultati raccolti in tre differenti esperienze sperimentali nazionali che si distinguevano per la presenza di forme diverse di PCVD.

Criterio discriminante per l'inclusione nello studio è stata la possibilità di poter raccogliere i dati dei gruppi sperimentali fino alla macellazione, avvenuta oltre i 270 gg di età. I gruppi vaccinati con Ingelvac CircoFLEX hanno presentato un significativo miglioramento dei dati esaminati, indifferentemente dalla forma di malattia presente o dalla tipologia di allevamento. La valutazione della riduzione della mortalità e degli scarti nei vaccinati vs controlli si è dimostrata, nei casi di allevamenti affetti da PCVD acuta o moderata, come parametro sensibile per una valutazione del beneficio conseguente all'introduzione della vaccinazione.

Summary: PCV2 associated disease (PCVD) is nowadays considered as one of the most important disease worldwide. Within PCVD different forms are described: acute (PMWS), moderate and mild ones. This study aimed to identify the parameters that have been modified after piglet vaccination with Ingelvac CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica) in farms presenting different forms of PCVD. Pre-requisite for the inclusion in the study has been the likelihood to collect the data of the experimental groups for the entire production cycle, with slaughter at more than 270 days of age. The groups vaccinated with Ingelvac CircoFLEX® expressed a significant improvement of the parameters evaluated, whatever was the PCVD form present in the farm. The evaluation of the reduction of mortality and runts has been demonstrated, in the cases of acute and moderate PCVD of the study, as sensitive parameter to be evaluated for the economic calculation of the benefit after vaccination.

Introduzione

La prima segnalazione della malattia da circovirus tipo 2 (PCV2) risale al 1996, quando la presenza del virus è stata riconosciuta come indispensabile per l'espressione della PMWS (Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome) (1,2,3). L'insieme delle patologie in cui

PCV2 è coinvolto è oggi riunito nell'acronimo PCVD (Porcine CircoVirus Disease o Malattia da Circovirus), una delle principali malattie del suino in tutto il mondo (4).

Nell'ambito della PCVD si riconoscono forme acute, riconducibili alla PMWS, e forme moderate o lievi, in cui l'assenza dell'espressione più drammatica della sintomatologia lascia spazio ad un aumento della mortalità e della percentuale di animali sottopeso o scarsamente performanti (scarti).

Da pochi anni sono disponibili su mercato differenti presidi immunizzanti contro PCV2: vaccino spento a virus intero, vaccino spento a sub-unità contenente ORF2 di PCV2, vaccino chimerico spento in grado di esprimere PCV2 e PCV1 (6,7,8,9).

I vaccini che hanno rivelato la maggiore efficacia in termini di protezione sono stati quelli in grado di esprimere una specifica risposta alla proteina capsidica. Questa proteina è stata riconosciuta come quella di maggiore importanza in termini di immunogenicità e di protezione (5). Per la valutazione del beneficio della vaccinazione risulta particolarmente importante identificare quali sono i parametri da sottoporre all'analisi del ritorno sull'investimento, escludendo tutti quei fattori che, pur interferendo con il reddito d'impresa, non possono essere modificati dalla vaccinazione nei confronti di PCVD.

Questo studio ha inteso individuare i fattori che sono stati modificati dopo vaccinazione con Ingelvac CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica) dei suinetti in allevamenti colpiti da forme cliniche differenti di PCVD. Tale obiettivo è finalizzato a segnalare i parametri principali da ponderare all'atto della valutazione del beneficio dalla vaccinazione.

Materiali e Metodi

Allevamenti

Sono stati esaminati i risultati raccolti in tre differenti esperienze sperimentali nazionali che si distinguevano per la presenza di forme diverse di PCVD.

Criterio discriminativo per l'inclusione nello studio è stata la possibilità di poter raccogliere i dati dei gruppi sperimentali fino alla macellazione, avvenuta oltre i 270 gg di età.

Nei primi due casi (C1 e C2), sono stati inclusi due allevamenti con forma acuta di PCVD, caratterizzata dalla presenza di una percentuale di scarti e mortalità superiori al 15% associate a deperimento, polmoniti, pallore della cute, ingrossamento dei linfonodi inguinali, frequente comparsa di patologie di irruzione secondaria caratterizzate da scarsa risposta ai trattamenti terapeutici con scarsa performance di crescita. Nel terzo caso (C3) è stato incluso un allevamento, 200 scrofe, multisede, che presentava una forma moderata di PCVD, con perdite totali di circa il 12%

Le caratteristiche principali degli allevamenti considerati all'interno dello studio sono riportate nella tabella 1.

Tabella 1: caratteristiche principali allevamenti
Table 1: main characteristic of the farm included

Caso	PCVD	Dimensione allevamento	tipologia
1	acuta	400 scrofe	multisede
2	acuta	700 scrofe	sito unico
3	moderata	2000 scrofe	multisede

La presenza di PCV2 nei casi 1 e 2 era stata dimostrata attraverso identificazione del genoma del virus nel sangue e nei tessuti dei suini clinici in fase post-svezzamento (siti due). L'analisi è stata corredata anche da una valutazione quantitativa della presenza di PCV2 nei campioni, tramite Q-PCR. In C3, la presenza di PCV2 era stata precedentemente evidenziata attraverso identificazione di PCV2 nei tessuti.

Suini inclusi nello studio

Caso 1 e 2:

I suini inclusi nella prova sono stati allocati casualmente al gruppo vaccinato (CircoFLEX) o di controllo. Entrambi i gruppi hanno condiviso le medesime strutture dove erano raggruppati in differenti box (vaccinati e controlli). Il trasferimento tra le sezioni è avvenuto nel medesimo periodo, pertanto entrambi i gruppi hanno avuto in comune ambiente, alimentazione e condizioni microclimatiche.

Sono stati allocati allo studio 381 suini nel gruppo CircoFLEX e 397 nei controlli nel sito sperimentale C1, 261 (CircoFLEX) e 261 (controlli) in C2.

Inoltre, sono stati pianificati prelievi di sangue su 10 suini per gruppo sperimentale, il giorno della vaccinazione (T0), 4 settimane dopo (T1), nel momento della comparsa della PCVD (T2) e prima della macellazione (T3).

Sono stati raccolti per ogni gruppo, e per ogni sezione di alloggiamento, numero di suini entrati ed usciti, età, morti, scarti, peso all'ingresso e all'uscita. Inoltre, sono state valutati i pesi delle carcasse la macello, oltre che l'età dei suini al macello.

Caso 3

Nella azienda C3 è stato condotto uno studio SPC (Statistical Process Control), dove sono stati messi a confronto i dati di 6 lotti di suini di controllo precedenti alla vaccinazione con 6 lotti vaccinati. In totale sono stati inclusi 7199 suini di controllo vs 7367 vaccinati. Sono stati raccolti, per ogni gruppo e per ogni sezione di alloggiamento, numero di suini entrati ed usciti, morti, scarti e la settimana di macellazione

Vaccino

Per l'immunizzazione attiva dei suinetti è stato utilizzato un vaccino inattivato a sub-unità (Ingelvac CircoFLEX®, Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica). Il vaccino contiene la proteina capsidica ORF2 di PCV2 come componente antigenica e un polimero acquoso, ImpranFlex®, come adiuvante.

I suini allocati nei gruppi CircoFLEX sono stati vaccinati con 1 ml di Ingelvac CircoFLEX®, in dose unica, somministrato per via intramuscolare, vicino allo svezzamento.

Statistica

La mortalità e la percentuale di scarti sono stati confrontati utilizzando il test Chi-quadrato (C1,C2,C3) (Statistica® v8.0, Statsoft®, USA) mentre le differenze dei pesi e dell'età al macello sono stati analizzati mediante two-sample t-test (C1 e C2) (SAS System, SAS Inst., Cary, North Carolina, v 8.2).

Calcolo economico

I risultati raccolti dalla vaccinazione nell'allevamento con forma moderata (C3) sono stati sottoposti ad una valutazione di ordine economico. La metodologia ha preso in esame la mancata opportunità di vendita per i suini morti e scarti: tale valore ha considerato il valore di un suino medio, da cui è stato sottratto il costo dell'alimento non consumato. Le assunzioni considerate ai fini del calcolo sono state: prezzo medio alimento EURO 200/ton, IC di 3,9, prezzo di mercato per il suino grasso di 1,25 €/Kg e valore dello scarto 0,3€7Kg.

Risultati

I suini vaccinati non hanno presentato alcuna reazione avversa, né locale né sistemico.

L'inclusione è avvenuta in **C1** a 28 gg di vita, nell'allevamento **C2** a 27 gg mentre in **C3** a due mesi di età.

Per quanto riguarda le due esperienze raccolte nelle aziende con la fase acuta, la malattia associata all'infezione da PCV2 in **C2** è comparsa già 4 settimane dopo lo svezzamento, mentre in **C1** circa 45 gg dallo svezzamento. I prelievi di sangue sono stati effettuati a età differenti, in relazione alla sospetta comparsa della PCVD (vedi tabella 2)

Tabella 2: Protocollo dei prelievi di sangue

Table 2: blood sampling time

<i>prelievo</i>	<i>età (gg di vita)</i>	
	C1	C2
T0	28	27
T1	56	55
T2	70	-
T3	270	270

Allo svezzamento nessun campione di sangue è risultato PCR positivo per PCV2. Nell'allevamento **C2** la comparsa della PCVD è stata registrata precocemente, con viremia 4 settimane dopo lo svezzamento. Pertanto non si è proceduto con il prelievo T2. Una seconda fase viremica è stata registrata in associazione alla comparsa dei sintomi riferibili a PCVD nell'ultimo mese prima della macellazione solo nei suini di controllo. Per contro, nessun campione da soggetti vaccinati è risultato positivo alla PCR per PCV2.

La concomitanza tra evidenza clinica e viremia da PCV2 è stata rilevata al tempo T2 nella azienda **C1**. In questo sito sperimentale i suini di controllo sono risultati viremici già nel prelievo precedente (T1), nonostante non presentassero ancora alcun segno clinico. Si segnala che la PCVD si è espressa in tutta la sua magnitudine circa 7 giorni dopo il prelievo al T1. (tabella 3)

	CASO 1				CASO 2			
	Vaccinati		controlli		Vaccinati		controlli	
	viremici	q-PCR	viremici	q-PCR	viremici	q-PCR	viremici	q-PCR
T0	0	negativa	0	negativa	0	negativa	0	negativa
T1	0	negativa	100	5,2 - 5,5	0	negativa	40	3,6 - 9,7
T2	30	3,5 - 4,5	100	3,5 - 7,8				
T3	0	negativa	0	negativa	0	negativa	70	3,7 - 6
	(%)	(min-max)	(%)	(min-max)	(%)	(min-max)	(%)	(min-max)

Tabella 3: q-PCR per PCV2

Table 3: q-PCR per PCV2

In corso di prova sono emerse evidenze di co-infezioni sostenute da agenti sia batterici che virali. Di particolare gravità è stato l'impatto dell'infezione da *Actinobacillus pleuropneumoniae* nella azienda **C1**, osservato dopo il trasferimento nel sito 3. In **C1** la

mortalità durante la permanenza nel sito 2 è stata superiore nei controlli vs vaccinati (8,8% vs 2,1%; $p < 0,0001$) e tale differenza si è amplificata nel sito 3 (28,4% vs 7,4%; $p < 0,0001$). Il dato cumulativo di mortalità nei controlli vs vaccinati, dallo svezzamento alla vendita, è risultato rispettivamente del 34,3% vs 9,2% ($p < 0,0001$).

Nel secondo allevamento (C2) la mortalità è stata superiore nei controlli in tutte le sezioni, con significatività statistica in svezzamento ($p < 0,02$) e ingrasso ($p < 0,001$). Il dato cumulativo è stato di 4,2% nei vaccinati vs 12,6 nei controlli ($p < 0,001$).

Anche la percentuale di scarti è stata decisamente inferiore nei gruppi vaccinati rispetto i controlli. Segnatamente, in **C1** è risultata del 5,2% vs 9,6% ($p < 0,03$) mentre in **C2** è stata del 7,3% vs 13,8% nei controlli ($p < 0,02$). (Tabella 4 e 5)

Analogamente ai miglioramenti a carico dei parametri sanitari, in tutti i gruppi vaccinati è stato apprezzato una migliore performance di crescita. Nel primo allevamento gli animali vaccinati hanno raggiunto il macello a 285 gg di età vs 300 dei controlli ($p < 0,001$), con un peso medio delle carcasse di 130,3 Kg per il gruppo CircoFLEX vs 129,3 dei controlli.

In **C2** la macellazione è avvenuta a 303 gg di età per i vaccinati vs 304 dei controlli, con un peso medio delle carcasse di 140,6 per il gruppo CircoFLEX vs 135,5 dei controlli ($p < 0,01$).

Tabella 4: caso 1, mortalità e scarti. ($p\text{-value} \geq 0.05$ non statisticamente significativo – ns)
Table 4: Case 1, mortality and runts ($p\text{-value} \geq 0.05$ not significant – ns)

<i>Periodo</i>	<i>Parametro</i>	CircoFLEX	<i>Controllo</i>	<i>p-value</i>
SITO 2	Mortalità, (%)	2.1	8.8	< 0.0001
	Scarti, (%)	0.5	0.8	ns
SITO 3	Mortalità, (%)	7.4	28.4	< 0.0001.
	Scarti, (%)	4.9	9.8	< 0.02
TOTALE	Mortalità, (%)	9.2	34.3	< 0.0001.
	Scarti, (%)	5.2	9.6	< 0.03

Tabella 5: caso 2, mortalità e scarti. ($p\text{-value} \geq 0.05$ non statisticamente significativo – ns)
Table 5: Case 2, mortality and runts ($p\text{-value} \geq 0.05$ not significant – ns)

<i>Periodo</i>	<i>Parametro</i>	CircoFLEX	<i>Controllo</i>	<i>p-value</i>
SVEZZAMENTO	Mortalità, (%)	0.8	3.8	< 0.02
	Scarti, (%)	1.9	9.6	< 0.001
MAGRONAGGIO	Mortalità, (%)	2.4	2.7	n.s.
	Scarti, (%)	2.4	2.2	n.s.
INGRASSO	Mortalità, (%)	1.2	7.9	< 0.001
	Scarti, (%)	3.3	2.8	n.s.
TOTALE	Mortalità, (%)	4.2	12.6	< 0.001
	Scarti, (%)	7.3	13.8	< 0.02

Nella prova condotta nella azienda con a forma moderata della malattia da circovirus sono stati confrontati i dati raccolti da 6 gruppi prima dell'introduzione della vaccinazione con i primi sei gruppi vaccinati. Un Totale di 6903 controlli e 6776 vaccinati sono stati macellati ad una età media di 42 settimane. La macellazione dei controlli è iniziata la seconda settimana di marzo e si è conclusa alla quarta di aprile. I vaccinati sono stati, invece, macellati a partire dalla prima settimana di maggio, fino alla seconda di giugno.

Le perdite totali, calcolate dall'ingresso nel sito 2 alla macellazione, sono state significativamente inferiori nel gruppo CircoFLEX (8%) rispetto ai controlli (12,4%) ($P < 0,0001$).

La mortalità nei due gruppi è stata del 1,8% (controlli) vs 1,4 (CircoFLEX) durante la permanenza nel sito due e del 4,5% vs 2,2% nel sito tre ($p < 0,0001$).

Per quanto concerne gli scarti, i valori percentuali sono stati pari a 1,2 (controlli) vs 2,4 (CircoFLEX) ($p < 0,0001$) nel sito due e 4,5 (controlli) vs 3,3 (CircoFLEX) nel tre ($p = 0,0007$).

(tabella 6)

Tabella 6: caso 3, mortalità e scarti. (p -value ≥ 0.05 non statisticamente significativo – ns)
Table 6: case 3, mortality and runts (p -value ≥ 0.05 not significant – ns)

<i>Periodo</i>	<i>Parametro</i>	CircoFLEX	Controllo	<i>p-value</i>
Sito 2	Mortalità %	1,4	1,8	ns
	Scarti, %	1,2	2,4	<0,0001
Sito 3	Mortalità %	2,2	4,2	<0,0001
	Scarti, %	3,3	4,4	0,0007
Totale	Mortalità %	3,6	5,8	<0,0001
	Scarti, %	4,5	6,6	<0,0001

La valutazione di ordine economico ha considerato l'impatto che mortalità e scarti hanno sulla vendita. Tale interferenza è stata considerata come "opportunità di vendita perduta". La significativa differenza nelle perdite totali tra i gruppi ha prodotto un vantaggio per i vaccinati pari a €5,45/capo.

Discussione

I gruppi vaccinati con Ingelvac CircoFLEX® hanno presentato un significativo miglioramento, indifferentemente dalla forma di malattia presente o dalla tipologia di allevamento.

L'analisi dei parametri che risentono favorevolmente della vaccinazione ha identificato nella riduzione della mortalità e della percentuale di scarti elemento comune tra le diverse prove. In C1, C2 e C3 i suini vaccinati hanno sempre assicurato una riduzione statisticamente significata delle perdite totali. In corso di forma acuta il miglioramento osservato è stato di tale entità da non richiedere una valorizzazione economica(10,11). Differente può essere lo scenario nelle forme meno gravi di PCVD, dove l'impatto inferiore della mortalità e scarti sul reddito d'impresa, suggerisce una valutazione precisa del beneficio conseguente alla implementazione di piani vaccinali prevalentemente mirati alla riduzione dei parametri sopra citati. L'analisi economica effettuata sui dati raccolti in C3 ha fornito un evidente indicazione di beneficio, pari a €5,45/capo, proveniente esclusivamente dalla riduzione delle perdite totali senza computare parametri di crescita e di età di macellazione.

La valutazione della viremia dopo vaccinazione non è stata, al contrario, riconosciuta come

parametro significativo al fine di confermare l'efficacia della vaccinazione. Il valore della viremia era già stato precedentemente indagato (12,13) in specifici studi dove era stata dimostrata la presenza di una relazione diretta tra viremia e crescita nella popolazione non vaccinata e l'assenza di tale relazione dopo vaccinazione.

Nelle due esperienze in cui è stato possibile valutare anche la crescita degli animali, segnatamente in C1 e C2, l'età alla macellazione e/o il peso delle carcasse hanno evidenziato significativi miglioramenti, corroborando i benefici già garantiti dalla riduzione delle perdite.

Il sistema di valutazione basato sul calcolo della mancata opportunità di vendita ha rappresentato un efficace strumento per descrivere più accuratamente il beneficio assicurato dalla vaccinazione.

La valutazione della riduzione della mortalità e degli scarti nei vaccinati vs controlli si è dimostrata, nei casi di allevamenti affetti da PCVD acuta o moderata, come esercizio efficace per impostare una valutazione sul beneficio conseguente agli effetti della vaccinazione.

Bibliografia:

- 1- Allan GM, McNeilly F, Ellis J, Krakowka S, Botner A, McCullough K, et al. PMWS: experimental model and co-infections. *Vet Microbiol* 2004;98(2):165–8.
- 2- Rovira A, Balasch M, Segales J, Garcia L, Plana-Duran J, Rosell C, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 2002;76(7):3232–9.
- 3- Clark T. Pathology of the postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs. In: First proceedings of the Western Canadian association of swine practitioners. 1996. p. 22–5.
- 4- Segales J. (2007): Global, local, and individual perspectives on PCVD. 20-25, Kernkamp Lecture at Lemman Conference
- 5- Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, Keranflec'h A, Baudouard MA, Cordioli P, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 2003;21(November (31)):4565–75.
- 6- Allan G, McNeilly F. PMWS/PCVD: diagnosis, disease and control: what do we know? Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress. 2006.
- 7- Ju C, Fan H, Tan Y, Liu Z, Xi X, Cao S, et al. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 2005;109(August (3–4)):179–90.
- 8- Wang X, Jiang W, Jiang P, Li Y, Feng Z, Xu J. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. *Vaccine* 2006;24(April (16)):3374–80.
- 9- Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces
- 10- Terreni M., Caleffi A., Arioli E., Cerati C., Benaglia P., Gamba F., Persico F., Martelli P. Efficacia della vaccinazione dei suinetti verso PCV2 in allevamenti con Malattia da Circovirus (PCVD) Atti XXXV SIPAS meeting 2009: 496-506
- 11- Terreni M., Caleffi A., Arioli E., Persico F., Martelli P. Suini contro il Circovirus: Efficacia della vaccinazione verso PCV2 in allevamenti colpiti da Malattia da Circovirus (PCVD). *ODV*,(2009) 6: 25-29.
- 12- Maass P., Liesner G.B., Orveillon F.X., Fachinger V. Impact of PCV2 viremia in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Proceedings of the 1st ESPHM, Copenhagen, Denmark, 2009: 61*
- 13- Holck H., Edler R., Diaz E. Correlation between viral load and performance in PCV2 vaccinated or non-vaccinated pigs. Allen D. Lemman Swine Conference 2009: 167