

**MONITORAGGIO DELLE INFEZIONI DA PCV2
NEGLI ALLEVAMENTI PIEMONTESI: DALLA DIAGNOSI ALLA
CARATTERIZZAZIONE DEI FENOTIPI ISTOLOGICI**

***MONITORING OF PCV2 INFECTIONS IN PIEDMONT FARMS:
FROM DIAGNOSIS TO THE CHARACTERIZATION
OF HISTOLOGICAL PHENOTYPES***

**ELENA BOZZETTA, KATIA VARELLO, CHIARA MUSELLA,
MARIA ELENA CAREDDU, GIULIANO PISONI(1), FABIO ZUCCON,
RICCARDO MADONNA (2), MARCO MONTESANO (2),
MARCO FACCENDA (2), FRANCO KOBAL (2), VITTORIO SALA(1)**

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
(1) Dipartimento di Patologia Animale,
Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Università degli Studi di Milano
(2) Medico Veterinario libero professionista*

Parole chiave: suino, PCV2, grading istopatologico .

Key words: swine, PCV2, histo-pathological grading.

Riassunto. Istopatologia e immunoistochimica, eseguite su panel di organi prelevati dalle mortalità aziendali giornaliere, sono strumenti fondamentali per una diagnosi certa di PCVD. L'applicazione di questo sistema in cinque allevamenti della regione Piemonte ha consentito di verificare l'applicabilità di un grading istologico alle lesioni rilevate. La correlazione tra il grading e l'esame immunoistochimico è stata osservata nella maggior parte delle lesioni classificate con grado 2-3 di deplezione e 1-2 di flogosi, mentre le lesioni classificate con deplezione 1 sono state più spesso negative all'IHC. Inoltre non si sono riscontrate positività IHC in assenza di lesioni caratteristiche, anche quando il virus è presente perché altamente circolante.

Summary. Histopathology and immunoistochemistry tests performed on a panel withdrawn from daily farm mortalities are fundamental tools for the diagnosis of PCVD. The application of this system in five farms of the Piedmont region has allowed verifying the reliability of a histological grading. The correlation between grading and IHC has been observed in lesions classified with degree 2-3 of depletion and 1-2 of inflammation, while the lesions classified with depletion 1 have been more often negative to the IHC. Moreover, IHC positivity has not been found without lesions, also when highly circulating virus is present.

INTRODUZIONE

Le infezioni da PCV2 sono responsabili di un gruppo di sindromi, da tempo conosciute come Porcine Circovirus Diseases (PCVDs), e tra queste la Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) può essere considerata quella clinicamente

più importante; la sua diffusione in tutti i sistemi suinicoli del mondo, dal 1999 in poi, ha rappresentato solo l'emersione di un problema latente da molti anni, come hanno confermato le indagini sierologiche retrospettive.

Nella diagnosi di PMWS, l'associazione della sintomatologia e delle lesioni con quantità indicative di PCV2 o del suo acido nucleico è una discriminante essenziale, mentre i criteri per l'identificazione della PCVD sono ancora incerti; alcuni allevamenti possono avere mortalità individuali occasionali, spesso epidemiologicamente inspiegabili, che tuttavia ricordano molto quanto si osservava, pur in assenza di certezze diagnostiche, prima dell'emergenza PMWS.

Per definirne le caratteristiche, il consorzio europeo per le malattie da circovirus tipo 2, ha dato alcune precise indicazioni: una di queste è l'aumento inatteso della quota mortalità di almeno 1,66 x 2 volte la deviazione standard per un periodo di almeno due mesi, rispetto ai tre mesi immediatamente precedenti, utilizzati come riferimento storico aziendale; per la conferma anatomo-istopatologica, è necessario eseguire l'esame necroscopico su animali morti di recente o all'uopo sacrificati (cinque soggetti è la soluzione ottimale): la diagnosi è positiva solo se si trovano tutte le lesioni tipiche in almeno uno dei suini.

Le alterazioni indicative sono linfadenopatia inguinale, enterite, polmonite e ittero a livello macroscopico, deplezione linfocitaria e infiltrazione istiocitaria del tessuto linfoide, corpi inclusi e cellule giganti a livello istopatologico; l'evidenziazione immunohistochimica o biomolecolare di PCV2 conferma la diagnosi.

L'obiettivo di accertare l'effettiva rilevanza delle infezioni da PCV2 negli insediamenti suinicoli piemontesi, e in particolare in quelli del cuneese, ha motivato la costituzione di un gruppo di lavoro che ha coinvolto l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (sede centrale di Torino e sezione territoriale di Cuneo), la sezione di Malattie Infettive del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria dell'Università di Milano e alcuni suiatrati operanti nei territori interessati dalle indagini; i primi risultati della collaborazione, tuttora in corso, sono riportati in questa breve nota .

MATERIALI E METODI

Allevamenti e campionamento

Il protocollo d'intervento è stato comunicato a un gruppo di veterinari pratici nel corso di una riunione preliminare nel mese di aprile 2008; lo stesso ha previsto la selezione degli allevamenti sulla base delle indicazioni del progetto di ricerca europea "Control of Porcine Circovirus Diseases (PCVDs): Towards Improved Food Quality and Safety", basate su rilievi epidemiologici temporizzati in ambito aziendale e campionamenti delle mortalità per gli accertamenti diagnostici.

L'idoneità delle aziende proposte dai veterinari aderenti è stata verificata mediante un sopralluogo iniziale, durante il quale sono state verificati i dati produttivi, con particolare riguardo alla fase di svezzamento, nonché prelevati campioni ematici a venti suinetti appartenenti a gruppi con evidenti manifestazioni di deperimento progressivo; sono state inoltre eseguite le necroscopie degli svezzati morti nelle ultime 24 ore e date le indicazioni per il conferimento di altri soggetti nel caso che il numero esaminato fosse minore di cinque.

Per ogni allevamento è stata compilata una scheda segnaletica, allo scopo di identificare i fattori di rischio epidemiologico nel management aziendale; il campionamento ha interessato polmoni, tonsille, linfonodi tracheo-bronchiali, milza e linfonodi inguinali; i prelievi sono stati divisi in parti uguali: una è stata immediatamente fissata in formalina tamponata al 10% per l'esame istopatologico e l'altra refrigerata in contenitori separati per le indagini di biologia molecolare (PCR), che sono state eseguite anche nei confronti di PRRSV, allo scopo di verificarne la presenza, come unico agente eziologico o in concomitanza con PCV2.

La presenza di lesioni indicative di patologie coesistenti o di complicità ha attivato tutti gli accertamenti diagnostici necessari a stabilirne l'effettiva causa.

Le caratteristiche salienti delle aziende considerate fino ad oggi sono riassunte in tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche delle aziende esaminate.

N. progressivo	Ciclo	N. scrofe	Età svezz. (giorni)	Durata svezz.
1	Chiuso completo (mono-sito)	400	28	50
2	Chiuso completo (tre siti)	1.600	25	30
3	Aperto (mono-sito)	160	28	60
4	Aperto (mono-sito)	600	25	30
5	Chiuso completo (tre siti)	1.500	21	40

Esame istologico

I campioni sono stati ridotti, processati e inclusi in paraffina; si è poi proceduto al taglio microscopico su piani differenti di sezioni seriali di $4\pm 2\mu$ di spessore, destinate alla colorazione con ematossilina ed eosina (EE) e all'esame immunohistochimico (IHC) per il rilievo di PCV2; presenza e gravità delle lesioni indicative di PCV2 nelle sezioni colorate con EE hanno determinato l'attribuzione di un punteggio, secondo lo schema proposto da Opriessnig & coll. (2007).

Secondo tale schema, la presenza di flogosi istiocitaria e/o granulomatosa nel tessuto linfoide e la deplezione del tessuto linfatico comportano l'attribuzione di punteggi da 0 a 3, mentre nel polmone la flogosi interstiziale granulomatosa, l'iperplasia del tessuto linfoide peribronchiolare e la presenza di essudato alveolare sono quantificate con valori da 0 a 6.

Colorazione IHC per PCV2

Dopo lo sparaffinamento e la reidratazione delle sezioni, si è proceduto allo smascheramento antigenico incubando i vetrini per 15 minuti a 37°C in una soluzione di proteasi allo 0,07%; il blocco delle perossidasi endogene è stato ottenuto immergendo i preparati in una soluzione di perossido d'idrogeno al 3% in metanolo.

I vetrini sono stati ricoperti con sieralbumina bovina (BSA) 5% e messi a incubare in camera umida a temperatura ambiente per 30 minuti al fine di saturare eventuali legami aspecifici; successivamente, le sezioni di ogni campione e del controllo positivo sono state incubate in camera umida con il siero monoclonale anti-PCV2 (Ingenansa, Spagna) diluito 1:200 in PBS pH 7.3 per 60 minuti a temperatura ambiente.

Al termine dell'incubazione, i vetrini, dopo due lavaggi in PBS per 4 minuti ciascuno, sono stati ricoperti con l'anticorpo secondario fornito dal ChemMate™ Dako Envision™ Detection Kit Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse e posti ad incubare per 20 minuti in camera umida a temperatura ambiente; il legame dell'anticorpo secondario è stato evidenziato attraverso l'incubazione finale con la soluzione cromogena di 3,3-diaminobenzidina (DAB). I vetrini sono stati infine controcolorati con Emalume acido di Mayer.

Le sezioni sono poi state esaminate al microscopio ottico a ingrandimenti 4, 10, 20 e 40x e valutati come positivi in base alla presenza di precipitati bruni presenti nelle cellule dendritiche follicolari e nell'infiltrato infiammatorio mononucleare e gigantocellulare; l'idoneità della reazione è stata valutata per confronto con campioni di linfonodo suino (positivo e negativo) provenienti da infezione sperimentale e precedentemente testati per PCV2.

Polymerase Chain Reaction

Il DNA è stato estratto da 25 mg di tessuto mediante l'utilizzo del kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Milano, Italy).

Per la diagnosi di PCV-2 sul DNA estratto è stata eseguita una PCR con i primers PCV2f ATGACGTATCCAAGGAGGCG e PCV2r GGATATTGTAGTCCTGGTCG che amplificano un frammento di 620bp corrispondente alla regione ORF2 di PCV-2; il protocollo di amplificazione prevede 35 cicli di amplificazione a 95°C per 50s, 58°C per 50s, e 72°C per 60s.

L'RNA è stato estratto da da 25 mg di tessuto mediante l'utilizzo di Trizol (Invitrogen, Milano, Italy) e successivamente è stato retrotrascritto con primers random in cDNA mediante l'utilizzo del kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Milano, Italy). Per la diagnosi di PRRSV sul cDNA è stata eseguita una PCR con i primers PRRSf GCCCCTGCCCAICACG e PRRSr TCGCCCTAATTGAA-TAGGTGA descritti in Oleksiewicz et al. (1998) che amplificano un frammento di circa 640bp della regione ORF7 di PRRSV (American-type e European-type); il protocollo di amplificazione prevede 40 cicli di amplificazione a 95°C per 40s, 60°C per 40s, e 72°C per 60s.

I prodotti di PCR sono stati successivamente analizzati mediante elettroforesi in gel d'agarosio e marcatura con etidio bromuro.

Risultati e considerazioni

La tabella 2 riporta i risultati delle diagnosi eseguite sul materiale prelevato durante le necroscopie eseguite nei cinque allevamenti; in proposito, proponiamo qui di seguito descritti.

Azienda 1. Il grading delle lesioni ha mostrato punteggi compresi tra 0 e 1, sia per il tessuto linfoide, sia per il polmone, nel quale sono state però rilevate lesioni piogranulomatose, multifocali. L'esame immunoistochimico e PCR sono risultati negativi su tutti i campioni.

Azienda 2. sui cinque soggetti campionati, due hanno presentato lesioni compatibili con PCV2, associate a positività immunoistochimica e in PCR di tutti gli organi esaminati; in questi animali, il grading ha indicato lesioni tra 1 e 3 per la deplezione e tra 1 e 2 per l'infiltrazione istiocitaria. Per quelle polmonari, il valore rilevato è stato tra 3 e 4, con positività immunoistochimica ed alla PCR in due soggetti.

In un suinetto con lesioni compatibili, la positività immunoistochimica e PCR ha

interessato solo alcuni organi linfoidi, ma non il polmone. Nei due animali restanti, l'IHC è risultata sempre negativa, mentre la PCR positiva solo in alcuni organi di uno di essi.

Azienda 3. sui quattro soggetti esaminati, solo uno ha mostrato in tutti gli organi lesioni compatibili, associate a positività immunoistochimica e PCR; gli altri tre hanno presentato lesioni compatibili, ma IHC e PCR solo su alcuni organi.

Nei soggetti positivi il grading ha indicato lesioni tra 1 e 3 per la deplezione e tra 1 e 2 per l'infiltrazione istiocitaria; per il polmone era tra 2 e 4, con positività immunoistochimica ed alla PCR in tre soggetti.

Azienda 4. Solo un soggetto dei cinque campionati ha presentato lesioni compatibili in tutti gli organi, associate a positività immunoistochimica e PCR, che nei suini restanti hanno interessato solo alcuni organi; il grading ha indicato lesioni tra 2 e 3 per la deplezione, e pari a 2 per l'infiltrazione istiocitaria. Per il polmone il grading è stato compreso tra 0 e 4, con positività immunoistochimica in un soggetto e in due alla PCR.

Azienda 5. Le lesioni riscontrate sono state scarsamente indicative di un'infezione da PCV2, come hanno confermato i punteggi di grading tra 0 e 1 del tessuto linfoide; nel polmone è stato possibile rilevare lesioni piogranulomatose da multifocali a diffuse. L'esame immunoistochimico è risultato negativo su tutti i campioni in accordo con i risultati della PCR.

In tutti i soggetti è stata rilevata una diffusa positività alla PRRS in PCR.

Discussione

La caratterizzazione epidemiologica e clinica aziendale delle malattie da PCV2 (PCVDs) è spesso condizionata da diverse variabili strutturali e manageriali, che la rendono di difficile comprensione; in queste situazioni, la diagnosi si basa più sulla interpretazione che sul dato oggettivo, che si può ottenere solo con un intervento, correttamente gestito, del laboratorio.

Alla fine, un approccio diagnostico corretto alle patologie da PCV2, e alla PMWS in particolare, presenta problemi organizzativi, spesso difficilmente gestibili; l'indispensabilità della dimostrazione su base istologica dell'associazione lesione-virus è ormai un fatto generalmente accettato e, in questa prospettiva, correttezza analitica del dato anamnestico, qualità del campionamento e completezza dell'esame istologico sono passaggi decisivi, ma anche assai impegnativi. In ogni caso, il percorso diagnostico non dovrebbe considerarsi conclusivo con il solo esame istologico mediante colorazione con ematossilina-eosina, poiché i corpi inclusi indicativi della presenza dell'agente sono difficilmente riscontrabili nelle lesioni. (Sarli et al., 2008).

Di conseguenza, è ancora molto diffuso, perché più semplice, l'impiego della sierologia o della ricerca del genoma virale mediante PCR, che però, non potendo dimostrare la presenza delle lesioni, non ha un valore decisivo; in altri casi, invece, è disponibile l'esame istologico, ma manca la dimostrazione della presenza di PCV2. In generale, tessuto linfoide e polmone rappresentano i materiali diagnostici più affidabili: tuttavia, la corrispondenza tra le lesioni istopatologiche indicative e la positività immunoistochimica per PCV2 è molto più elevata per il primo rispetto al secondo (Sarli et al., 2007). Anche in questo caso, infatti, si è riscontrata una situazione sovrapponibile, a lesioni anche gravi (classificate con valori da 4 a 6) non sempre è corrisposta positività per PCV2 all'IHC ed anche alla PCR. In particolare

si è potuto notare come tra gli elementi presi in considerazione per la valutazione del polmone quello che si è dimostrato più indicativo d'infezione è la proliferazione del tessuto linfoide peribronchiale. Infatti, nei campioni di tessuto polmonare risultati positivi all'esame immunistoichimico questo reperto era sempre riscontrabile. Altre lesioni quali la polmonite interstiziale o l'iperplasia dei setti alveolari sembrano invece anche correlabili alle infezioni concomitanti, come dimostra la frequenza del reperto di PRRSV.

Nel tessuto linfoide, l'elemento più frequentemente riscontrato è stata la deplezione linfocitaria di gravità variabile fino alla perdita della struttura follicolare; la flogosi associata si presentava da lieve a moderata, ma contrariamente a quanto descritto in letteratura, non sono state evidenziate lesioni granulomatose con completa sostituzione del follicolo e presenza di cellule multinucleate. Va inoltre rilevato che nei campioni analizzati finora non sono stati evidenziati corpi inclusi in accordo con quanto precedentemente segnalato da Sarli et al (2008)

Per quanto riguarda la relazione tra il grading e l'esame immunistoichimico si può evincere che la positività è stata riscontrata nella maggior parte delle lesioni classificate con grado 2-3 di deplezione e 1-2 di flogosi, mentre le lesioni classificate con 1 per la deplezione hanno presentato più frequentemente negatività immunistoichimica, in accordo con quanto descritto da Luppi et al (2004). Inoltre non si sono riscontrate positività immunistoichimiche in campioni con assenza di lesioni caratteristiche seppure ne sia possibile in alcuni soggetti dimostrare la presenza del virus (Sarli et al 2008) a causa della ormai nota diffusione del virus nella popolazione. (Allan et al 2000)

Per finire, ci pare opportuno rilevare come l'attribuzione di un "grading" alle lesioni istopatologiche possa rappresentare, oltre e insieme alla valutazione immunistoichimica, un contributo alla correttezza delle interpretazioni e quindi alla completezza diagnostica; la correlazione delle osservazioni diagnostiche con le caratteristiche strutturali e manageriali delle aziende non è al momento possibile, visto il numero ridotto di verifiche, ma costituisce uno degli obiettivi del lavoro.

Resta inoltre aperto il quesito riguardante la presenza concomitante dei due virus immunocondizionanti (PRRSV e PCV2) nelle sindromi di svezzamento; perciò, l'estensione delle valutazioni ad altri allevamenti e l'integrazione dei prelievi diagnostici, considerando anche una comparazione "evolutiva" delle lesioni in gruppi sperimentali appositamente selezionati (lavoro già in corso) potrà ulteriormente dare indicazioni al riguardo.

Tabella 2. Grading istologico, risultati immunistoichimici e biomolecolari

Legenda: il primo numero (a) indica la deplezione linfocitaria, il secondo (b) la flogosi granulomatosa es. a/b. N.d. = campioni autolitici

Table 2. Histopathological grading, immunohistochemical and molecular results

Explanation: first number (a) show lymphoid depletion, the second (b) show granulomatous inflammation e. g.: a/b. N.d. = autolytic samples



ALLEVAMENTO		GRADING ISTOLOGICO					IHC/PCR					
Soggetto	Polmone	Tonsilla	Linfonodo tracheo-bronchiale	Milza	Ileo	Linfonodo inguinale	Polmone	Tonsilla	Linfonodo tracheo-bronchiale	Milza	Ileo	Linfonodo inguinale
1	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
2	3	/	1/0	/	/	1/0	Neg/Neg	/	Neg/Neg	/	/	Neg/Neg
	3	2/2	2/2	2/0	1/0	2/2	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos
	4	3/1	3/2	2/0	2/1	3/2	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos
	4	2/2	2/0	2/0	2/0	1/0	Neg/Neg	Pos/Pos	Pos/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Pos
	4	Nd	1/0	2/0	2/0	1/0	Neg/Neg	Neg/Pos	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Pos	Neg/Pos
3	4	2/0	2/0	2/0	1/0	2/0	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos
	2	Nd	2/1	2/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	1	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	4	Nd	2/1	2/0	2/0	1/0	Pos/Pos	Neg/Pos	Pos/Pos	Neg/Pos	Neg/Pos	Pos/Pos
	4	3/2	3/2	3/2	3/2	3/2	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos
4	2	3/2	3/2	3/2	3/2	1/0	Neg/Neg	Pos/Pos	Pos/Pos	Neg/Pos	Neg/Pos	Neg/Pos
	1	3/2	3/2	2/2	Nd	3/2	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Pos	Neg/Pos	Neg/Pos	Neg/Pos
	3	3/2	3/2	3/2	3/2	2/2	Neg/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Neg/Pos	Neg/Pos
	3	3/2	3/2	3/2	3/2	2/2	Neg/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Neg/Pos	Pos/Pos
	6	1/0	1/0	0/0	0/0	1/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
5	4	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	4	0/0	0/0	0/0	Nd	Nd	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg

Tabella 3. Evidenze diagnostiche per PCV2 e PRRSV nelle aziende considerate.

	Istopat.	IHC	PCR
Azienda 1			
PCV2	Negativa	Negativa	Negativa
PRRSV	=	=	Positiva
Azienda 2			
PCV2	Positiva	Positiva	Positiva
PRRSV	=	=	Positiva
Azienda 3			
PCV2	Positiva	Positiva	Positiva
PRRSV	=	=	Positiva
Azienda 4			
PCV2	Positiva	Positiva	Positiva
PRRSV	=	=	Positiva
Azienda 5			
PCV2	Negativa	Negativa	Negativa
PRRSV	=	=	Positiva

Bibliografia

- Allan G.M., Ellis E.J.: 2000, Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12:3-14
- Chae C. (2004) Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *The Veterinary Journal*, 168. 41-49.
- Chae C. (2005) A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal*, 169. 326-336.
- Ghebremariam M.K e Gruys E. (2005) Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs with particular emphasis on the causative agent, the mode of transmission, the diagnostic tools and the control measures. A review. *Veterinary Quarterly*, 27. 105-116.
- Harding J.C.S. (2004) The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Veterinary microbiology*, 98, 131-135.
- Luppi A., Meriardi G., Bonialuri P, Dottori M., Cantoni A.M., Cabassi E., Corradi A. (2004) Grading cito-istologico delle lesioni linfonodali in corso di PMWS del suino. *Atti SIPAS*, XXX. 477-485.
- Mandrioli L., Sarli G., Ostanello F., Sidoli L., Caprioli A., Preda P, Segales J., Marcato P.S.: Nefrite interstiziale associata all'infezione da PCV-2 del suino. *Atti SIPAS*, XXIX. 297-302.
- Marcato P.S., Sidoli L., Mandrioli L., Della Salda L., Cerati C., Rolla G.L. (1999) Indagini clinico patologiche in un focolaio di PMWS (Postweaning multisystemic wasting syndrome) in suini del nord Italia. *Large Animals Review*, 5(2), 47-62.
- Martelli P, Terreni M., Borghetti P, Amenna N., Morvan H., Cavarani S. (2000) Aspetti clinici e diagnostici in corso di un focolaio di sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (PMWS). *Atti SIPAS*, XXVI. 255-269.
- Marruchella G., Cossettini C., Cabassi E., Corradi A., Di Lecce R., Pinoni C., Candotti P. (2001): La sindrome dermatite nefrite del suino (PDNS): rilievi clinici, anatomo-istopatologici e virologici in un allevamento del Nord-Italia. *Atti SIPAS* XXVII. 169-178.
- Sala G., Rigola S., Alberali G.L., Brocchi E., Cordioli P. (2000) Development of monoclonal antibodies based ELISAs for the detection of antibodies against porcine circovirus type 1 and type 2. *Proceeding of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy*, 253-254.
- Opriessnig T., Thacker E.L., Yu S., Fenaux M., Meng X.-J., Halbur P.G.: 2004, Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 41:624-640.
- Sarli G., Ostanello F, Morandi F, Nigrelli A., Alberali L., Dottori M., Vezzoli F, Barigazzi G., Sala. V, Leotti G. (2007) "Applicazione di un protocollo per la diagnosi di PMWS". *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*. XXXIII Meeting Annuale 189-202.