

RISULTATI PRELIMINARI SULL'IMPIEGO DI UN PROTOCOLLO DIAGNOSTICO PER LA VALUTAZIONE DEL COINVOLGIMENTO DEL PCV2 NELLA PATOLOGIA RIPRODUTTIVA DEL SUINO

PRELIMINARY RESULTS OF A DIAGNOSTIC PROTOCOL FOR THE ASSESSMENT OF PCV2 INVOLVEMENT IN SWINE REPRODUCTIVE FAILURE

MORANDI F.¹, PANARESE S.¹, MASERATI A.², GRANITO G.², DOTTORI M.³,
BONILAUDI P.³, LUPPI A.³, LELLI D.⁴, LEOTTI G.⁵,
BIANCHI M.⁵, BRUNETTI B.¹, FERRARA D.¹, BIANCO C.¹, VILA T.⁶,
JOISEL F.⁶, OSTANELLO F.¹, SARLI, G.¹

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna; Veterinario libero professionista²; IZSLER Reggio Emilia³ e Brescia⁴; Merial Italia⁵; Merial S.A.S., Lione⁶

Parole chiave: PCV2, patologia riproduttiva, protocollo diagnostico.

Key Words: PCV2, reproductive failure, diagnostic protocol.

Riassunto. Sin dalla prima segnalazione di coinvolgimento di PCV2 in casi di aborto e natimortalità, a causa della bassa carica virale e delle lesioni fetali non sempre rilevanti, è risultato difficile stabilire un protocollo diagnostico per le patologie riproduttive associate al virus. L'obiettivo dello studio è stato quindi quello di testare un protocollo diagnostico da poter applicare ad allevamenti nei quali si sospetti il coinvolgimento di PCV2 nelle patologie della sfera riproduttiva: sui campioni raccolti è stato eseguito un primo test di screening mediante PCR ed i casi positivi sono stati sottoposti ad una tecnica *in situ* (immunoistochimica, IHC). Diagnosi di coinvolgimento di PCV2 nell'evento denunciato è stata data quando ad una PCR positiva si è avuto il riscontro di una positività IHC o presenza di anticorpi anti-PCV2 nel siero. I campioni raccolti provenivano da due aziende (A e B) con problemi riproduttivi. Solo in una azienda l'iter diagnostico è stato conclusivo e completato dall'approccio *in situ* oltre che dal riscontro in due sieri di anticorpi anti-PCV2. Nonostante questo, in entrambi gli allevamenti, dove erano stati esclusi altri importanti patogeni (Aujeszky's disease virus (ADV), porcine parvovirus (PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), la percentuale di suinetti e/o feti abortiti, mummificati, nati morti o disvitali, si è mostrata, sebbene con valore statisticamente non significativo, più alta nelle nidiate PCR+, rispetto a quelle negative. Alla luce dei risultati ottenuti, l'impiego di tecniche *in situ* quali IHC per la diagnosi di patologia riproduttiva associata a PCV2 non sembrano da sole garantire un sufficiente livello di sensibilità.

Abstract. Since the first report of PCV2 involvement in aborted and stillborn foetuses, the low viral load and the inconstant presence of foetal lesions have made it difficult to adopt a suitable diagnostic protocol for reproductive failure associated to PCV2. The aim of this study was to apply a diagnostic protocol to farms with reproductive failures in which the involvement of PCV2 was suspected. In the diagnostic protocol, PCR was the screening test used to select the cases for further investigation by *in situ* technique (immunohistochemistry, IHC). The role as pathogen of PCV2 in an episode of reproductive failure was defined when PCR positivity was assessed in addition to either IHC positivity or presence of PCV2 antibodies in the serum. Two farms (A and B) with reproductive failures were sampled, but in only one the diagnostic protocol was successfully completed by the *in situ* techniques

and the finding of antibodies against-PCV2 in two sera. In both farms, where other important pathogens (Aujeszky's disease virus (ADV), porcine parvovirus (PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) can be excluded, the percentages of aborted, mummified, stillborn or weak-born piglets/foetuses, showed a higher trend in PCR+ than in PCR- litters. However, according to the results obtained, *in situ* techniques such as IHC for the diagnosis of PCV2 reproductive failure do not seem to guarantee a suitable level of sensitivity.

INTRODUZIONE

A partire dal 1998 quando il circovirus suino tipo 2 (PCV2) fu associato alla sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (*post-weaning multisystemic wasting syndrome* - PMWS), il suo coinvolgimento è stato riconosciuto in numerose altre forme patologiche del suino, tutte identificate con l'acronimo PCVD (*porcine circovirus diseases*) (Chae, 2005; Segalés *et al.*, 2005). Successivamente, il PCV2 è stato dimostrato essere coinvolto anche in patologie della sfera riproduttiva (West *et al.*, 1999; Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2001; Corradi *et al.*, 2004). L'ampia diffusione dell'infezione e l'assenza di un rapporto diretto causa-effetto fra presenza del virus e manifestazioni patologiche, ha elevato i test *in situ* (immunoistochimica - IHC - e ibridazione *in situ* - ISH -) che permettono di dimostrare la presenza del virus nel contesto delle lesioni istologiche (Brunborg *et al.*, 2004), a *gold standard* nella diagnosi delle PCVD (Segalés *et al.*, 2005). Questo aspetto ha permesso così di operare utilizzando protocolli diagnostici puntuali ed efficaci (Sarli *et al.*, 2009; Segalés *et al.*, 2005; Sorden, 2000). Al contrario, per quanto riguarda le patologie riproduttive associate a PCV2 la carica virale e le lesioni fetali non sono sempre elevate ed evidenti (Hansen *et al.*, 2010; Brunborg *et al.*, 2007) e addirittura assenti nella scrofa. Tale aspetto può rendere la diagnosi difficoltosa. Inoltre, a complicare maggiormente un possibile approccio diagnostico è la probabile presenza ambientale di PCV2 che obbliga a porre particolare attenzione alla modalità di prelievo dei campioni ed alla interpretazione di risultati positivi ai test d'indagine biomolecolare. In tale situazione, quindi, sembra essere la combinazione di più tecniche (IHC o ISH, RT-PCR e ricerca anticorpale nel siero) associata ad una scrupolosa modalità di prelievo dei campioni, a dare informazioni utili al complesso iter diagnostico della patologia riproduttiva associata a PCV2.

Lo scopo del presente lavoro è quello di presentare i risultati preliminari di un percorso per l'elaborazione di un protocollo diagnostico per un'azienda o per un veterinario aziendale che sospettino o vogliano indagare il coinvolgimento del PCV2 in problemi riproduttivi denunciati od osservati.

MATERIALI E METODI

Casistica

Presso il servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna sono stati conferiti complessivamente 91 suinetti e/o feti abortiti, mummificati, nati morti o disvitali (AMMD), appartenenti a due aziende (A e B) che denunciavano problemi riproduttivi (AMMD, ritorni in estro) e per i quali erano già state indagate altre cause infettive e non infettive responsabili del quadro denunciato. In particolare la casistica (tab. 1) è suddivisa come segue: 1) l'azienda A da 15 nidiatae costituite da 213 suinetti, ha raccolto e conferito presso la Sezione 66 AMMD, complessivamente il 31% del totale partorito con le 15 nidiatae; 2) l'azienda B, da 6 nidiatae costituite da 74 suinetti, ha conferito 25 AMMD, il 33,8% del totale partorito con le 6 nidiatae.

Necropsia e prelievo dei campioni

Tutti gli AMMD sono stati sottoposti a necropsia e relativamente alle condizioni di conservazione e disidratazione, in particolare dei soggetti mummificati, sono stati

costantemente campionati: il fegato, la milza, il cuore ed i linfonodi inguinali superficiali dei quali una parte veniva fissata in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina ed una parte congelata a -20°C. Inoltre, dai soggetti in buono e discreto stato di conservazione, aprendo il torace, è stato fatto prima di ogni altra manualità un prelievo del sangue contenuto nella vena cava caudale con siringa sterile.

Azienda	numero di suinetti AMMD* positivi a PCV2 in PCR	Nidiate esaminate	Nidiate PCR positive**	Suinetti AMMD/nidiate PCR+	Suinetti AMMD/nidiate PCR-
A	14 (21,2%)	15	7 (46,7%)	35,2%	23,5%
B	11 (44,0%)	6	4 (66,7%)	32,1%	22,2%

Tabella 1. Risultati della PCR: *Aborto/Mummificato/nato-Morto/Disvitale; **una nidiate è considerata PCR+ se almeno un AMMD risulta PCR+.

Table 1. PCR results: *Aborted/Mummified/stillborn/weak-born; **a litter is considered PCR+ when at least one piglet is PCR+.

Azienda	numero di suinetti AMMD* positivi a PCV2 in PCR	nidiate “problema”	Nidiate “problema” PCR positive**	Suinetti AMMD/nidiate PCR+	Suinetti AMMD/nidiate PCR-
A	10 (18,18%)	10	5 (50%)	44,2%	30,1%
B	11 (47,82%)	5	4 (80%)	32,1%	0***

Tabella 2. Risultati della PCR considerando solo le “nidiate problema” (aborto o nidiate con più di 4-5 MMD): *Aborto/Mummificato/nato-Morto/Disvitale; **una nidiate è considerata PCR+ se almeno un AMMD risulta PCR+; ***mancano le nidiate problema risultate PCR-

Table 2. PCR results considering only the target litters (aborts or litter with more than 4-5 MMD): *Aborted/Mummified/stillborn/weak-born; **a litter is considered PCR+ when at least one piglet is PCR+; ***none PCR-target litter.

Protocollo diagnostico utilizzato

I campioni sono stati esaminati seguendo lo schema riportato in figura 1. Un pool ottenuto da tutti gli organi prelevati da ogni singolo feto è stato sottoposto a PCR per PCV2 (Sarli *et al.*, 2010). Su ogni singolo pool è stata inoltre eseguita la ricerca del genoma virale di PPV (porcine parvovirus), ADV (Aujeszky’s disease virus) e PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus), rispettivamente secondo quanto descritto da Bonilauri *et al.* (2003), Katz e Pedersen (1992) e Kim *et al.* (2001). I casi in cui è stata evidenziata la presenza di PCV2 sono stati quindi sottoposti alle metodiche istologiche di routine per allestire sezioni di circa 4 micron da sottoporre a colorazione ematossilina-eosina (E-E) ed immunoistochimica (IHC). Per quest’ultima è stato usato un anticorpo monoclonale anti-PCV2 (Mab F217), alla diluizione di 1/100 in tampone fosfato, gentilmente fornito dal Dr. G.

Allan (Veterinary Sciences Division, Belfast, UK), secondo il metodo descritto da Sarli *et al.* (2009), modificato utilizzando un complesso di rilevazione streptavidina-biotina-perossidasi polimerico (SuperPicture kit peroxidise, Zymed® Lab).

Sui sieri ottenuti per centrifugazione del campione di sangue prelevato è stata condotta la ricerca di anticorpi anti-PCV2 usando un kit (SERELISA® PCV2 Ab, Synbiotic, Lyon, France) (Perreul *et al.*, 2010), PPV, ADV e PRRSV utilizzando test ELISA di tipo competitivo, standardizzati presso l'IZSLER (Brocchi *et al.*, 1990; Cordioli *et al.*, 1996; Sala *et al.*, 2000).

La nidiata è stata considerata positiva quando almeno uno dei soggetti esaminati (proveniente dalla stessa nidiata) è risultato positivo alla ricerca del genoma virale (PCR+). Tuttavia, il PCV2 è stato considerato responsabile dell'episodio di patologia riproduttiva associato ad AMMD quando i campioni esaminati sono risultati positivi alla ricerca del genoma virale e contestualmente è stata messa in evidenza una positività all'IHC o alla ricerca di anticorpi anti-PCV2 nel siero dei prodotti del concepimento. (fig. 1).

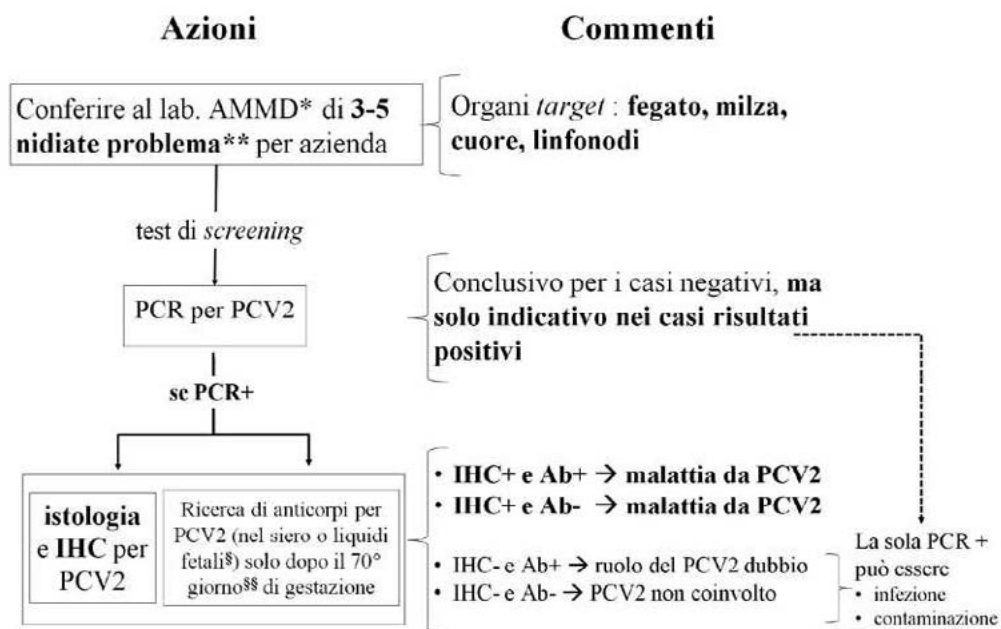


Figura 1. Diagramma di flusso del protocollo diagnostico in aziende con problemi riproduttivi in cui si sospetti un ruolo del PCV2. * Aborto/Mummificato/nato-Morto/Disvitale; **aborto o nidiata in cui si registrano almeno 4-5 mummificati/nati-morti/disvitali; §il siero si può ottenere prelevando il sangue dalla vena cava caudale mentre i liquidi fetali sono rappresentati dal materiale siero ematico che spesso si raccoglie nelle cavità in seguito a congelamento/scongelo del feto; §§feto/mummificato ≥170mm di lunghezza (testa-ischio prelevato con calibro rigido) (Straw *et al.*, 2006).

Figure 1. Flow chart of the diagnostic protocol in farms with reproductive failures suspected to be associated with PCV2 infection. *Aborted/Mummified/stillborn/weak-born; **abort or litter with more than 4-5 mummified/stillborn/weak-born piglets; §sampling blood from the caudal vena cava; fetal liquids are those collected from the body cavities after freezing and thawing; §§fetus/mummified ≥170mm in crown-to-rump length (Straw *et al.*, 2006).

RISULTATI

Nell'azienda A sono risultati PCR+, complessivamente, 14 dei 66 suinetti esaminati (21,2%); in 7 delle 15 nidiatae (46,7%) è stato rilevato almeno un soggetto PCR+ (tab. 1). Nell'azienda B sono risultati PCR+ 11 su 25 suinetti (44,0%) e 4 nidiatae su 6 (66,7%).

Nelle nidiatae positive provenienti dall'azienda A, il 35,2% dei suinetti era nato morto, disvitalo o mummificato; tale percentuale si riduce al 23,4% nelle nidiatae PCR-.

Nelle nidiatae positive provenienti dall'azienda B, il 32,1% dei suinetti era nato morto, disvitalo o mummificato mentre tale percentuale era del 22,2% nelle nidiatae PCR-.

La tabella 2 riporta i risultati ottenuti dalle valutazioni condotte considerando esclusivamente le nidiatae che potevano rientrare nella definizione di "nidiata problema", caratterizzate cioè da aborto o dalla presenza, sul totale dei nati, di almeno 4-5 soggetti caratterizzati da AMMD. Secondo questo criterio interpretativo, la percentuale di soggetti AMMD in nidiatae PCR+ passa dal 35,2% al 44,2% contro il 30,1% evidenziato nelle nidiatae PCR- dell'azienda A.

Le osservazioni necroscopiche ed istologiche non hanno mostrato lesioni riconducibili all'infezione da PCV2, mentre l'immunoistochimica (figura 2) ha evidenziato una seppur debole positività intracitoplasmatica negli epatociti, focale nei miocardiociti ed in rare cellule dendritiche nel linfonodo inguinale superficiale di due suinetti appartenenti ad una stessa nidiata dell'azienda A.

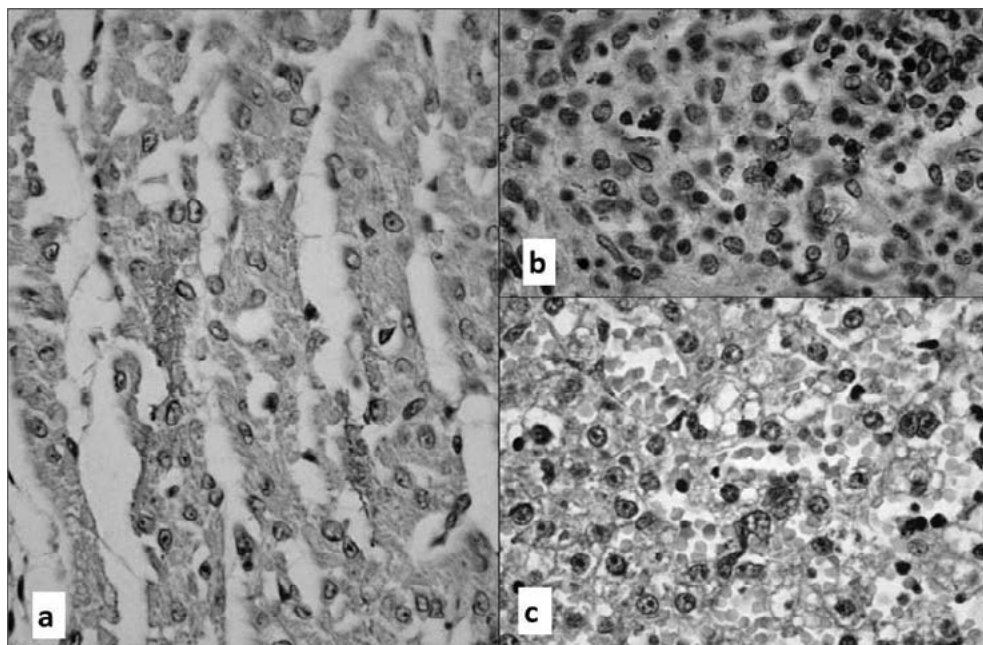


Figura 2. Suino. Soggetto nato morto: a. cuore, debole e multifocale reazione immunoistochimica positiva per PCV2 nel sarcoplasma di alcuni miocardiociti, 400x; b. linfonodo inguinale superficiale, moderata e focale reazione immunoistochimica positiva per PCV2 nel citoplasma di alcune cellule dendritiche, 400x; c. fegato, debole e multifocale reazione immunoistochimica positiva per PCV2 nel citoplasma di alcuni epatociti, 400x.

Figure 2. Stillborn piglet: a. heart, multifocal and weak immunoistochemical positivity to PCV2 into the sarcoplasma of some myocardocytes, 400x; superficial inguinal lymph node, focal and moderate immunoistochemical positivity to PCV2 in the cytoplasm of dendritic cells, 400x; c. liver; multifocal and weak immunoistochemical positivity to PCV2 in the cytoplasm of hepatocytes, 400x.

Solo due sieri sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-PCV2 e, in entrambi i casi, provenivano da soggetti PCR-, appartenenti a due differenti “nidiata problema” (un aborto PCR- ed una nidiata PCR+ con 11 nati morti su 18) dell’azienda A.

In nessuno soggetto esaminato è stato evidenziato il genoma di ADV, PRRSV o PPV o relativi anticorpi specifici.

DISCUSSIONE

Secondo Segalés *et al.* (2006), la diagnosi di patologia riproduttiva associata all’infezione da PCV2 può essere emessa quando sono contemporaneamente presenti i seguenti aspetti: a) aumento del numero di AMMD, b) lesioni miocardiche fibrotiche e/o necrotizzanti, c) riscontro di PCV2 nel contesto delle lesioni. Tuttavia, alla luce di quanto riportato successivamente da Hansen *et al.* (2010) e Brunborg *et al.* (2007) questi tre criteri non sembrano sempre sufficienti a definire, escludendolo o dimostrandolo, il ruolo del PCV2 in episodi di patologia riproduttiva. E’ noto infatti che la carica virale dimostrabile in corso di PCVD o PMWS (Brunborg *et al.*, 2004) è sensibilmente più elevata di quanto non sia dimostrabile nel caso di patologie riproduttive associate all’infezione da PCV2 (Hansen *et al.*, 2010; Brunborg *et al.*, 2007). Ne consegue quindi che i criteri interpretativi impiegati per le PCVD e relativi alla quantità di virus presente nel contesto delle lesioni (10^7 copie di DNA virale per 500ng di acido nucleico estratto – Hansen *et al.*, 2010; Brunborg *et al.*, 2007) non possano essere estesi anche nei casi di patologia riproduttiva PCV2-associata. Altro aspetto critico da prendere in considerazione è rappresentato dalla diversa sensibilità delle tecniche di quantificazione della presenza del virus nei tessuti (IHC e real-time PCR) attualmente utilizzate. In considerazione del fatto che la soglia di sensibilità dell’IHC è relativamente alta, necessitando di almeno 10^7 copie di DNA virale per 500ng di acido nucleico estratto, è evidente come le metodiche *in situ* possano frequentemente fornire esiti falsamente negativi. A tal proposito gli stessi Autori (Hansen *et al.*, 2010) suggeriscono che il riscontro in una nidiata di un feto con $>10^7$ copie DNA virale per 500ng di acido nucleico estratto o di due feti con 10^4 - 10^7 copie DNA virale per 500ng di acido nucleico estratto sia sufficiente per formulare, utilizzando una tecnica real-time PCR, la diagnosi di episodio di patologia riproduttiva sostenuta da PCV2.

In una sola delle due aziende prese in esame nel corso del presente lavoro (azienda A), il protocollo impiegato, seppur con il conferimento di AMMD da 10 “nidiata problema”, ha messo in evidenza delle reazioni positive alla tecnica *in situ* utilizzata (IHC) portando ad ipotizzare che PCV2 possa aver avuto un ruolo nel determinismo dei problemi riproduttivi osservati nell’allevamento.

Nell’azienda B, di cui sono stati conferiti AMMD da 4 nidiata, l’intero iter diagnostico si è concluso solo con l’ipotesi di una probabile infezione da PCV2. Altro aspetto sicuramente meritevole di approfondimenti, ma di per sé interessante anche se non statisticamente significativo, è che i risultati mostrano in entrambe le aziende una percentuale di AMMD più alta in nidiata PCR+ rispetto alle PCR-, differenza che tende ad aumentare valutando in modo più restrittivo i risultati stessi. Questi aspetti assumono maggiore importanza qualora, come nel caso dell’azienda A, due suinetti presentano anticorpi anti-PCV2 e nessuna evidenza, diretta o indiretta, di infezione sostenuta da PPV, PRRSV e ADV.

CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati presentati seppur preliminari e delle considerazioni esposte, l’impiego di tecniche *in situ* quali IHC per la diagnosi di patologia riproduttiva associata a PCV2 non sembrano da sole garantire un sufficiente livello di sensibilità.

A tal proposito si può concludere che, per la corretta valutazione di un possibile coinvolgimento del PCV2 in episodi di patologia riproduttiva, è indispensabile:

1) inviare al laboratorio tutti i soggetti AMMD, provenienti da nidiata con più di 4-5 AMMD

- e, possibilmente, inviare non meno di 6-7 nidiate per azienda;
- 2) prestare particolare attenzione alle modalità di prelievo dei campioni da esaminare allo scopo di evitare contaminazioni;
 - 3) quando possibile, prelevare il sangue per la ricerca di anticorpi specifici per PCV2 ed altri agenti abortigeni dalla vena cava caudale o, come descritto da Perreul et al. (2010), prelevando liquidi fetali intracavitari.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano L. Mieli, Laboratoire de Développement et d'Analyses 22 (LDA22), Saint-Brieuc, France.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Meriardi G., Dottori M. (2003) "Longitudinal study of PRRSV infection in 6 breeding herds by ELISA-antibody test and serum pooled PCR". 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases- Roma June 29th July 2nd, pp.98-99.
2. Brocchi E., Berlinzani A., Callegari S., Gamba D., Civardi A. (1990) "Realizzazione di un test ELISA-competizione per distinguere animali infetti da virus di Aujeszky da animali vaccinati con vaccini gl-deleti". *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie* **44**, 913-917.
3. Brunborg I.M., Jonassen C.M., Moldal T., Bratberg B., Lium B., Koenen F., Schonheit J., (2007) "Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study". *J Vet Diagn Invest* **19**, 368-375.
4. Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. (2004) "Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR." *J Virol Methods*. **122**:171-178.
5. Chae C. (2005) "A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases". *Vet J* **169**, 326-336.
6. Cordioli P., Sala G., Brocchi E., Gamba D., De Simone F., (1996) "Diagnostic use of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus". *Proc. 14th International Pig Veterinary Society Congress*, p. 86.
7. Corradi A., Dottori M., Gaiadella L., Rosignoli C., Cantoni A.M., Luppi A., Bonilauri P., Meriardi G., Faccini S., Costa A., Leotti G., Cabassi E. (2004) "Infezione da porcine circo virus tipo 2 (PCV2) e aborto". *Atti XXX Meeting Annuale SIPAS*, 215-221.
8. Hansen MS, Hjulsgaard CK, Bille-Hansen V, Haugegaard S, Dupont K, Høgedal P, Kunstmann L, Larsen LE. (2010) "Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures". *Vet Microbiol*. **144**, 203-209.
9. Katz J.B., Pedersen J.C. (1992) "Molecular analysis of pseudorabies viral vaccines and their rapid differentiation from wild-type isolates using DNA-amplified glycoprotein I and thymidine kinase gene segment polymorphisms". *Biologicals* **20**,187-195.
10. Kim J., Choi C., Han D.U., Chae C. (2001) "Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR". *Vet Rec*. **149**, 304-305.
11. Ladekjaer-Mikkelsen A.S., Nielsen J., Storgaard T., Bøtner A., Allan G., McNeilly F. (2001) "Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt". *Vet Rec* **148**, 759-760.
12. O'Connor B, Gauvreau H, West K, Bogdan J, Ayroud M, Clark EG, Konoby C, Allan

- G, Ellis JA. (2001) "Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit." *Can Vet J.* 42, 551-3.
13. Perreul G., Fily B., Longo S., Vila T., Herin JB., Venet J., Joisel F. (2010) "Porcine circovirus type 2 (PCV2) prevalence in abortions in France". Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada July 18-21, p. 1111.
 14. Sala G., Rigola S., Alborali 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". In: Proc. 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, pp. 253–254.
 15. Sarli G., Morandi F., Panarese S., Bacci B., Ferrara D., Fusaro L., Bacci M.L., Govoni N., Dottori M., Bonilauri P., Lelli D., Leotti G., Vila T., Joisel F., Ostanello F. (2010) "Scrofe convenzionali fecondate con seme artificialmente infettato con circovirus suino tipo2 (PCV2)". XXXVI Congresso SIPAS, 25-26 Marzo, Montichiari, Brescia (Italy), pp. 254-263.
 16. Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Gnudi M., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2009) "Application of a protocol for the diagnosis of PMWS in Italy". *Vet Rec.* 164, 519-523.
 17. Segalés J., Allan G.M., Domingo M., (2006) "Porcine circovirus diseases". In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 299–307.
 18. Segalés J., Allan G.M., Domingo M. (2005) "Porcine circovirus diseases". *Anim Health Res Rev* 6, 119-142.
 19. Sorden S.D. (2000) "Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)". *Swine Health Prod.* 8, 133-136.
 20. Straw B.E., Dewey C.E., Wilson M.R. (2006) "Differential Diagnosis of Swine Diseases". In: *Diseases of Swine*, ed. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, and Taylor DJ, 9th ed., Chapter 3, pp. 41-85. Ames, IA.
 21. West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA. (1999) "Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2". *J Vet Diagn Invest.* 11, 530-2.