

Università degli Studi di Pisa

Facoltà di Medicina Veterinaria

Corso di Laurea in Medicina Veterinaria

***Indagine sulla prevalenza di Circovirus tipo II
(PCV-2) nella popolazione di cinghiali (Sus
scrofa) delle province di Grosseto e Pisa***

Candidato:

Martina Ricci

Relatore:

Prof. Alessandro Poli

Relatore:

Prof.ssa Patrizia Bandecchi

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

INDICE

| | |
|---|---------|
| RIASSUNTO | pag. 3 |
| CAPITOLO 1: IL CIRCOVIRUS SUINI | |
| 1.1 Cenni storici: la scoperta dei Circovirus suini | pag. 4 |
| 1.2 Caratteristiche biologiche dei Circovirus suini | pag. 5 |
| 1.3 Epidemiologia | pag. 10 |
| 1.4 Manifestazioni morbose associate a PCVs: segni clinici e lesioni | pag. 14 |
| 1.5 Diagnosi | pag. 33 |
| CAPITOLO 2: IL CIRCOVIRUS NEL CINGHIALE | pag. 37 |
| CAPITOLO 3: OBIETTIVO DELLA TESI | pag. 42 |
| CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI | pag. 44 |
| 4.1 Raccolta campioni | pag. 44 |
| 4.2 Indagini istopatologiche ed istochimiche | pag. 46 |
| 4.3 Indagini di immunofluorescenza | pag. 47 |
| CAPITOLO 5: RISULTATI | pag. 49 |
| CAPITOLO 6: CONCLUSIONI | pag. 69 |
| ALLEGATI | pag. 73 |
| RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI | pag. 84 |

RIASSUNTO

Parole chiave: Circovirus suino tipo II, cinghiale europeo, Sindrome da deperimento organico post-svezzamento, immunofluorescenza, linfonodo

Il circovirus suino tipo 2 (PCV-2) è un agente eziologico molto piccolo (17 nm) a simmetria icosaedrica, privo di envelope contenente DNA a singolo filamento circolare. Il virus, ampiamente diffuso negli allevamenti suini di tutto il mondo, è causa di patologie respiratorie, riproduttive nonché della sindrome nefrite e dermatite del suino (PDNS) e della sindrome da deperimento organico post-svezzamento (PMWS). La presenza del virus e le manifestazioni patologiche associate sono state dimostrate anche nel cinghiale.

Questa tesi si pone come obiettivo di raccogliere informazioni sulla prevalenza di PCV-2 e caratterizzare le lesioni organiche dei cinghiali nelle Province toscane di Pisa e Grosseto. Su un campione di 92 cinghiali provenienti dalla provincia di Pisa e di 52 cinghiali provenienti dalla provincia di Grosseto sono state condotte indagini istopatologiche ed istochimiche su vari organi per individuare la presenza di lesioni ed indagini di immunofluorescenza su tessuto linfoide per svelare la presenza dell'antigene virale di PCV-2. Si sono accertate lesioni a carico del tessuto polmonare, splenico, tonsillare e dei linfonodi. Lo studio ha rilevato una prevalenza per PCV-2 del 13% e del 42% rispettivamente nelle Province di Pisa e Grosseto. In conclusione si evince il ruolo di serbatoio di PCV-2 che il cinghiale gioca nei confronti del suino rappresentando un pericolo, soprattutto per quegli esemplari allevati al brado con il quale può venire facilmente in contatto. Queste considerazioni devono essere valutate nei futuri programmi di eradicazione di tale virus.

SUMMARY

Keywords: Porcine circovirus type 2, European wild boar, Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), Immunofluorescence, lymph node

The Porcine Circovirus type 2 (PCV-2) is a tiny etiologic agent (17nm) with icosahedric symmetry, and without envelope containing single stranded, circular jointed, DNA. The virus spread worldwide in the porcine breeding is responsible for breathing, reproductive pathologies, and for the Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS). The PVC-2 is also responsible for the post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome in pigs (PMWS). The incidences of the virus and its pathological effects have been widely demonstrated in the wild boars also.

The focus of this thesis is the determination of the prevalence of PCV-2 on a sample of wild boars coming from the provinces of Pisa, and Grosseto. Histopathological, and histochemical investigations were performed on a sample of 92 wild boars coming from the province of Pisa, and 52 wild boars coming from the province of Grosseto. Investigation were performed on several organs to detect the presence of lesions, including immunofluorescent investigation of the lymphoid tissue to reveal the presence of the viral PCV-2 antigen. Lesions of the pulmonary, splenic, tonsillar tissues, and of the lymph-nodes have been verified. The study has revealed a presence of the PCV-2 in 13% of the wild boars coming from the province of Pisa, and in 42% of the wild boars coming from the province of Grosseto.

Conclusion

This study makes evident the role that the wild boars play as a PCV-2 incubator for swine. These PCV-2 incubators pose a serious danger especially for those animals bred in the wild, which can easily come in contact with these infected wild boars. The findings of this research should be included in future eradication program of the virus.

CAPITOLO 1

IL CIRCOVIRUS SUINI

1.1 Cenni storici: La scoperta dei Circovirus suini

Il Circovirus suino tipo I è stato identificato per la prima volta nel 1974 come picornavirus-like contaminante della linea cellulare continua di rene suino PK/15 (*Tischer et al., 1974*).

In seguito è stato dimostrato come questo virus fosse un nuovo agente eziologico, molto piccolo, presentante simmetria icosaedrica, privo di envelope e contenete materiale nucleico formato da DNA a singolo filamento unito circolarmente da legami covalenti (*Tischer et al., 1982*). Proprio in virtù di questa singolare struttura l'agente eziologico fu chiamato "Circovirus".

Basandosi su prove con anticorpi monoclonali e policlonali verso PCV-1, il virus fu isolato da feti suini abortiti, da suinetti con tremori congeniti (tipo A-II) (*Hines e Lukert, 1994*) e recentemente il DNA di PCV-1 è stato identificato in Francia da linfonodi di un suinetto affetto da una sindrome da deperimento.

Un nuovo Circovirus è stato invece isolato per la prima volta in Canada (*Ellis et al., 1998*) da suini affetti da sindrome da

deperimento organico. Poco tempo dopo la scoperta del nuovo virus in Canada, agenti eziologici pressoché identici furono isolati da suini malati in America del nord (*Allan et al., 1998; Kuipel et al., 1998*), Europa (*Allan et al., 1998; Hinrichs et al., 1999; Kennedy et al., 1998*) e Asia controllando i quali, tramite antisieri monoclonali e policlonali, si è dimostrato come fossero delle entità biologiche distinte da PCV-1 successivamente classificati con il nome di PCV-2.

1.2 Caratteristiche biologiche dei Circovirus suini

PCV-1 e PCV-2 sono gli agenti virali di dimensioni più ridotte scoperti a tutt'oggi (17-20nm), privi di envelope, aventi simmetria icosaedrica e caratteristico genoma formato da acido desossiribonucleico organizzato in singolo filamento.

La densità di PCV-1 in CsCl è stata riportata essere 1.37g/cm³ da Tyscher e 1.33-1.34 g/cm³ da Allan et al. ed il coefficiente di sedimentazione è risultato essere di 57 S quando il virus è stato raffrontato al coefficiente di sedimentazione conosciuto di un Enterovirus bovino. PCV-1 è inoltre risultato essere non agglutinante

gli eritrociti di svariati animali testati e resistente all'inattivazione a pH 3, al cloroformio ed alla temperatura di 56°C.

La sequenza nucleotidica completa (1759 nt) del genoma circolare del PCV-1 contaminante della linea cellulare PK/15 è stata studiata a fondo (*Buhk et al., 1985; Mankertz et al., 1998; Meehan et al., 1997*) ed è stata proposta una modalità di replicazione e di circolarizzazione del materiale nucleico a singolo filamento tramite una temporanea presenza di DNA a doppio filamento. Entrambi i filamenti temporanei sono risultati essere codificanti proteine virali (*Meehan et al., 1997*).

Sette Open Readings Frames (ORFs) sono stati dimostrati in PCV-1 con proprietà codificanti proteine di peso maggiore di 5kD (*Mankertz et al., 1998; Meehan et al., 1997*).

Analisi delle proteine codificate da ORF1 di PCV-1 hanno dimostrato un'alto grado di omologia tra proteine virali e proteine codificate da ORF di nanovirus infettanti le piante (*Mankertz et al., 1998; Meehan et al., 1997*). Per questo motivo è stato proposto che le infezioni nei suini derivino e siano iniziate da un cambio di ospite da parte di un nanovirus delle piante che infettando un vertebrato si è ricombinato con un virus infettante i suini adattandosi quindi alla nuova specie (*Gibbs e Weiller, 1999*). Questa stretta omologia tra proteine

codificate da ORFs di nanovirus e ORFs di circovirus è stata documentata inoltre anche nel circovirus infettante il pappagallo (BFDV), agente patogeno della “Beak and Feather Disease”.

E' stato inoltre dimostrato che le maggiori proteine strutturali di PCV sono codificate da ORF2 (*Mankertz et al., 1998*).

Analisi di genomi di PCV-2 da isolati provenienti dall'America del Nord e dall'Europa hanno dimostrato l'appartenenza a gruppi strettamente correlati a PCV-1 con un'omologia maggiore del 96% (*Meehan et al., 1998*) nelle sequenze intranucleotidiche, nonché un'analogia nell'intera sequenza nucleotidica tra PCV-1 e PCV-2 dell'80% (*Hamel et al., 1998; Morozov et al., 1998*).

Un recente studio (*Hamel et al., 1998*) ha identificato 11 ORFs per PCV-2 potenzialmente codificanti proteine di dimensioni comprese tra 2kD a 36kD anche se altri studiosi (*Morozov et al., 1998*) contrastano questi risultati riconoscendo la presenza di soli 6 ORFs per PCV-2.

Lo studio di ORF1 tramite isolati di PCV-2 ha dimostrato un'omologia dell'83% per quanto riguarda la sequenza nucleotidica e dell'86% per quel che concerne le proteine codificate rispetto a PCV-1 (*Gibbs e Weiller, 1999; Morozov et al., 1998*).

L'analisi di ORF2 ha invece dimostrato un'analogia nucleotidica dell'67% e proteica del 65% rispetto a PCV-1.

Un'omologia aminoacidica del 61,5-62% tra ORF3 di PCV-2 e PCV-1 è stata dimostrata così come è stata identificata la stessa omologia in ORF4 che si attesta su valori del 83% (*Hamel et al., 1998; Harding 1996*).

La replicazione di PCVs in vitro è stata raggiunta tramite inoculazione di lisati contenenti il virus in monostrati semiconfluenti di linee cellulari PK/15 PCV-free (*Tischer et al., 1987*).

Nessun effetto citopatico in vitro viene riportato in letteratura e la replicazione virale viene normalmente monitorizzata tramite l'osservazione in luce fluorescente dei monostrati dopo utilizzo di anticorpi anti PCV-1 o PCV-2 coniugati con fluoresceina (*Allan et al., 1994; Tischer et al., 1987*).

Nella maggior parte delle cellule infettate sperimentalmente viene osservata una caratteristica e densa colorazione nucleare con larghi ed occasionali corpi inclusi citoplasmatici.

La replicazione di PCV-1 è stata dimostrata anche in linee cellulari suine diverse da PK/15 (*Allan et al., 1998; Tischer et al., 1982*), ed è stata appurata tra le altre la possibilità di replicazione nella linea cellulare Vero, dove PCV-1, in seguito a ripetuti passaggi, ha

dimostrato cambiamenti antigenici determinati con reattività a pannelli di anticorpi monoclonali (MAbs) anti PCV-1 (*Allan et al., 1994*).

E' stato evidenziato come la replicazione del DNA di PCVs sia dipendente dall'espressione enzimatica cellulare durante la fase S di crescita e che durante il ciclo virale in vitro la replicazione del materiale nucleico avviene esclusivamente se le cellule hanno passato la mitosi (*Tischer et al., 1987*).

Comunque la necessità che hanno i virus della mitosi cellulare per la replicazione del DNA può essere ovviata con l'inoculazione del monostrato cellulare, dopo l'infezione, con D-glucosamina-HCl nella dose di 300 mM appena prima l'entrata in fase S (*Tischer et al., 1974*).

Il trattamento con 300 mM di D-glucosamina-HCl del monostrato cellulare deve essere prolungato per 30 minuti per stimolare la crescita virale anche se deve essere fatta molta attenzione durante questa procedura proprio per la natura tossica del composto in questione.

1.3 Epidemiologia

PCV-1

Anticorpi sierici diretti verso PCV-1 sono stati dimostrati in suini esaminati in Germania (*Tischer et al., 1982; 1986; 1995*), Canada (*Dulac e Afshar, 1989*), Nuova Zelanda (*Horner 1991*), Inghilterra (*Edwards e Sands, 1994*) ed Irlanda del Nord (*Allan et al., 1994*) anche se l'infezione nei suini è molto probabilmente ubiquitaria.

Sono stati condotti diversi studi epidemiologici su PCV-1 all'interno degli allevamenti. In uno di questi studi (*Tischer et al., 1986*) condotto su sieri di animali regolarmente macellati in Germania viene riportato che nel 60% dei campioni presi in analisi erano presenti titoli anticorpali contro PCV-1 tanto alti quanto quelli che erano stati ritrovati in animali inoculati sperimentalmente da 2-6 settimane. Da questi dati gli autori hanno concluso che l'infezione nei suini probabilmente avviene nell'ultima fase di vita dell'animale cioè il finissaggio dove i suini sono costretti in stretto contatto.

In uno studio più approfondito (*Tischer et al., 1995*), è stato osservato, sempre in Germania, un calo nella percentuale degli animali sieronegativi con l'aumentare dell'età degli animali, che

andava dal 65% nei suinetti appena svezzati al 5,66% dei vecchi riproduttori.

Studi longitudinali effettuati su profili anticorpali di PCV-1 in 2 gruppi di suinetti in Irlanda del Nord hanno dimostrato che gli anticorpi materni forniti tramite il colostro spariscono all'incirca 8-9 settimane dopo la nascita (*Allan et al., 1994*). Gli anticorpi sierici riappaiono 13-15 settimane dopo la nascita indicando un'esposizione al virus 11-13 settimane dopo la nascita. Questo lasso di tempo corrisponde con lo spostamento dei suinetti dalla zona di svezzamento alla zona di ingrasso all'interno dell'allevamento.

Un'assenza completa di anticorpi anti-PCV-1 è stata dimostrata nel siero di bovini, ovini, polli, tacchini, capre, roditori e uomo (*Allan et al., 1994; Tischer et al., 1987*). In contrasto invece con questi studi, altri, svolti in Germania, dimostrano la presenza di anticorpi anti PCV-1, in uomo (30,2% dei soggetti analizzati), topo (12-69%), e bovino (35%), tramite l'utilizzo di tecniche che combinavano l'immunofluorescenza indiretta e la metodica ELISA (*Tischer et al., 1995*). Questi dati devono comunque essere ancora confermati.

PCV-1 è stato dimostrato essere infettante per colture cellulari di mononucleati di suino e bovino ma non di ovino o uomo.

L'escrezione di PCV-1 nelle feci e nel muco nasale è stata dimostrata 13-14 giorni dopo l'infezione in suinetti SPF di un giorno di vita inoculati sperimentalmente.

Nessun studio invece è stato effettuato sulle modalità di trasmissione in suini infettatisi naturalmente.

E' stata documentata la trasmissione verticale dopo isolamento ed inoculazione sperimentale in fattrici di un PCV-like virus da suini affetti da tremori congeniti anche se il virus in questione rimane ancora non caratterizzato (*Hines e Lukert, 1994*). Per questi motivi la possibilità di trasmissione verticale di PCV-1 rimane ancora da chiarire.

Non bisogna infine escludere la possibilità che l'alta sieroprevalenza di anticorpi anti-PCV-1 sia il risultato di una reazione crociata con PCV-2 e che gli strumenti analitici in nostro possesso ad oggi non abbiano ancora raggiunto una specificità tale da tipizzare due infezioni che hanno come eziologia due virus così simili.

PCV-2

Ad oggi è in aumento il numero di pubblicazioni che affrontano l'argomento riguardante la sieroprevalenza, le vie di escrezione e lo spettro d'ospite di PCV-2.

Da un recente studio (*Cotrell et al., 1999*) di sieroprevalenza effettuato su suini in Canada, utilizzando metodiche di immunofluorescenza indiretta con anticorpi anti-PCV-2, è emerso come il virus sia estremamente diffuso. Questo studio prendeva in esame tanto suini SPF ad alto stato sanitario quanto suini tenuti all'ingrasso in allevamenti e suini facenti parte del pool zootecnico di fattorie a conduzione familiare. Anticorpi diretti contro PCV-2 furono identificati in tutte le categorie di animali prese in analisi. Così come per PCV-1, anche per PCV-2 si riscontrò la presenza di anticorpi negli animali intorno alla terza-quarta settimana dopo lo svezzamento ovvero posteriormente al momento in cui i suini venivano spostati dai reparti di svezzamento a quelli di ingrasso, sicuramente più promiscui. Risultati del tutto sovrapponibili sono stati riportati nel Canada Occidentale (*Harding 1996; 1998*). Tramite metodiche di immunfluorescenza indiretta e metodiche più specifiche quali i tests ELISA per PCV-2, sono stati dimostrati immunoglobuline anti-PCV-2 anche in suini provenienti dalla Francia e Inghilterra (*Allan, dati non pubblicati*). Pertanto si può affermare così come avevamo fatto per PCV-1 che l'infezione non è confinata ad un paese o continente ma appare essere ubiquitaria.

Nessuno studio invece è stato effettuato sulle vie di escrezione di PCV-2 nell'infezione naturale anche se recentemente si sta indagando sulla trasmissione verticale di questo virus, ipotesi che sta prendendo piede sempre maggiormente.

E' stata infatti dimostrata in Canada Occidentale l'associazione di PCV-2 con casi di aborti in fattrici (*West et al., 1999*).

Antigeni appartenenti a PCV-2 sono stati identificati in lesioni di feti abortiti e successivamente il virus è stato isolato dai tessuti sede di lesione.

1.4 Manifestazioni morbose associate a PCVs:

Segni clinici e lesioni.

PCV-1

-Osservazioni sul campo-

Generalmente PCV-1 è considerato un agente apatogeno (*Allan et al., 1995; Tischer et al., 1995*). Nonostante questa convinzione ormai radicata un PCV-like virus è stato isolato da suini affetti da tremori congeniti (tipo A-II) e l'infezione è stata riprodotta verticalmente in suinetti iniettando scrofe gravide con omogeneizzati tissutali infetti (*Hines e Lukert, 1994*).

Questo PCV-like virus non è mai stato tipizzato né genomicamente né antigenicamente e pochi dati sono stati riportati nel lavoro.

Tessuti fetali e sieri di suini provenienti da vari allevamenti con problemi riproduttivi sono stati testati in Irlanda del Nord per la presenza di PCV-1 (*Allan et al., 1994*), ma nessun titolo anticorpale è stato rilevato dai sieri anche se in un caso PCV-1 fu isolato da suinetti abortiti appartenenti ad un singolo allevamento.

Da questi risultati gli autori dello studio hanno concluso che l'assenza di anticorpi verso PCV-1 nei sieri testati dimostra che l'infezione transplacentare è assai rara e comunque avviene prima del raggiungimento della competenza immunitaria da parte dei suinetti.

-Osservazioni sperimentali-

Dopo infezione sperimentale con PCV-1 di 6 suinetti SPF di 9 mesi di età, il virus è stato ritrovato nelle feci e nei secreti nasali così come anticorpi verso PCV-1 sono stati riscontrati nel siero di tutti i soggetti (*Tischer et al., 1986*). Nonostante questi rilievi nessun animale mostrò segni clinici di patologia né, all'esame anatomopatologico, lesioni macroscopiche o microscopiche.

Nello stesso esperimento gli autori inocularono 4 suinetti di un giorno di vita con PCV-1 e nuovamente fallirono nel rilevamento

semeiologico di patologia o di lesioni macroscopiche all'esame post-mortem. Gli autori quindi conclusero che PCV-1 è agente eziologico di un'infezione asintomatica nei suini.

Un lavoro simile al precedente effettuato su suinetti privati del colostro materno ed inoculati in prima giornata con PCV-1, non è riuscito, analogamente ai precedenti, a dimostrare interessamento clinico dei soggetti, nonostante gli autori avessero riscontrato, tramite analisi con immunofluorescenza, la presenza del virus in sezioni criostatiche di linfonodi, polmoni, milza ed intestino degli animali. Le localizzazioni più frequenti per PCV-1 negli animali analizzati sono state: milza, timo e polmoni in associazione a monociti e macrofagi all'interno dei quali, dopo l'utilizzo di anticorpi coniugati con fluoresceina, era visibile un citoplasma brillante e quindi ricco di antigeni virali.

Gli autori, proprio da queste ultime osservazioni convennero che l'infezione da PCV-1 può portare ad una compromissione del sistema immunitario, con conseguenze indirette più gravi (*Allan et al., 1994*).

Questa conclusione è stata corroborata da risultati che dimostravano che dopo la contaminazione in vitro di macrofagi suini

con PCV-1 si persero alcune importanti funzioni immunitarie di queste cellule (*McNeilly et al., 1996*).

PCV-2

PCV-2 è stato associato al contrario di PCV-1 ad una serie di malattie nei suini, sia come agente eziologico primario sia in associazione ad altri agenti.

Polmonite

Associazioni tra PCV-2, polmoniti interstiziali e linfadenopatie sono state osservate nel 1996 in suinetti di 6 settimane di vita provenienti dalla California (*Daft et al., 1996*).

DNA di PCV-2 è stato rilevato in inclusioni in paraffina di porzioni di polmoni e linfonodi mediastinici tramite tecniche di ibridazione *in situ*. Le lesioni macroscopiche consistono in polmonite interstiziale con linfadenomegalia associata.

I polmoni appaiono privi di aree collassate ma di colorito tendente al rosso vivo con frequenti petecchie emorragiche superficiali. Le lesioni non sono distinguibili macroscopicamente da quelle provocate dal virus della sindrome riproduttiva respiratoria del suino (PRRSV), che spesso tra l'altro risulta essere presente in concomitanza di PCV-2, e da quelle batteriche ed in particolar modo da *Pasteurella*.

Pertanto importanza maggiore assumono le lesioni microscopiche per una diagnosi precisa di malattia.

Polmoni provenienti da suini naturalmente affetti da PCV-2 infatti mostrano all'esame istologico, con colorazione Ematossilina-Eosina, polmonite interstiziale da multifocale a diffusa con infiltrato linfo-istiocitario. Occasionalmente l'infiltrato infiammatorio presente nei setti alveolari può essere esclusivamente di natura granulomatosa con spazi alveolari contenenti cellule epitelioidi e cellule giganti. I setti alveolari appaiono sdoppiati con presenza di alveolociti di tipo II iperplastici ed ipertrofici. Si notano cambiamenti, oltre che del parenchima, anche delle vie aeree, che presentano un epitelio bronchiale e bronchiolare necrotico o estremamente appiattito e ridotto. Accumuli di fibroblasti sono spesso presenti intorno alle vie aeree colpite e nello spessore della lamina propria. Le vie aeree più profondamente colpite possono mostrare erosioni multifocali e fibrosi; il lume può apparire parzialmente o completamente oblitterato da tessuto connettivo fibroso all'interno del quale possono essere reperibili piccoli cluster di cellule respiratorie di natura epiteliale.

Antigene o acido nucleico di PCV-2 può essere riscontrato comunemente negli aggregati istiocitici che circondano i bronchi e i bronchioli (B.A.L.T.) e occasionalmente all'interno delle cellule

epiteliali delle vie aeree. Antigene di PCV-2 può essere dimostrato anche all'interno di cellule dei setti alveolari e nei macrofagi all'interno degli spazi alveolari (*Ellis et al., 1998; Allan et al., 1999*). Inoculazioni sperimentali di PCV-2 in associazione a Parvovirus suino (PPV) in animali appena nati e privati del colostro hanno riprodotto molte delle lesioni presenti in casi naturali di infezione da PCV-2. In uno studio invece l'inoculazione di 4 suinetti con solo PCV-2 portò alla manifestazione della malattia polmonare in solo uno dei soggetti, suggerendo il sinergismo che i due virus sopraccitati esercitano. Anche sotto il punto di vista qualitativo infatti le lesioni risultarono di gravità maggiore nei soggetti infettati con PCV-2 e PPV (*Allan et al., 1999*). Le lesioni polmonari in questi esperimenti erano caratterizzate da diffusi infiltrati macrofagici da multifocali a diffusi, spesso interessanti le aree interstiziali intorno ai bronchioli. Uno dei suinetti sviluppò edema polmonare associato ad arterite caratterizzata da necrosi delle cellule endoteliali e proliferazione/infiltrato di mononucleati nello spessore della tonaca media. Queste lesioni vascolari non erano localizzate ai vasi polmonari ma riscontrabili in vari tessuti. Tramite indagini immunohistochimiche antigeni di PCV-2 furono anche osservati in cellule endoteliali vasali, cellule muscolari lisce e all'interno dei

manicotti perivascolari di mononucleati circondanti le arterie analizzate (*Ellis et al., 1999*).

Post-Weaning-Multisystemic-Wasting-Syndrome

(Sindrome da deperimento organico post-svezzamento)

Nel 1991 fu identificata per la prima volta, in suini provenienti dal Canada, una sindrome caratterizzata da deperimento organico e nel 1996 fu riportato uno studio pionieristico sull'argomento (*Clark, 1996; Harding, 1996*). Proprio per le caratteristiche della malattia, che consistono in una progressiva perdita di peso associata a lesioni in vari organi di suinetti appena svezzati, fu proposto dagli autori il nome di "Sindrome da deperimento organico post-svezzamento", dall'inglese "Post-Weaning-Multisystemic-Wasting-Syndrome" o "PMWS" in sigla.

Antigeni e acido nucleico di PCV-2 furono abbondantemente dimostrati nelle lesioni multisistemiche dei suinetti malati e successivamente il virus stesso fu isolato (*Ellis et al., 1998*).

Sempre nel 1996 autori diversi riportarono, in uno studio effettuato nel Nord della Francia, una sindrome da deperimento organico in suini appena svezzati ma non riuscirono ad isolare nessun agente causale. In seguito, le analisi di campioni conservati e provenienti

dal sopraccitato studio vennero analizzati per la presenza di PCV-2 che risultò essere abbondantemente presente.

Ad oggi la patologia viene comunemente diagnosticata e riscontrata in suini provenienti da allevamenti ad elevato status sanitario. Questi allevamenti risultano essere esenti dalle maggiori patologie enteriche e respiratorie che colpiscono i suini quali: polmoniti actinobacillari e da micoplasmi, rinite atrofica, salmonellosi, TGE e morbo di Aujeszky.

Più comunemente PMWS colpisce suini di età compresa tra le 5 e le 12 settimane di vita. I sintomi clinici di più frequente riscontro sono: deperimento e cachessia, dispnea, linfadenomegalia superficiale e meno frequentemente pallore, diarrea ed ittero (*Ellis et al., 1998; Harding, 1996*). La morbilità e la mortalità associate a PMWS variano molto in base allo stadio della malattia e al management dell'allevamento. In focolai acuti isolati la mortalità totale può raggiungere il 10%, mentre mortalità e morbilità in allevamenti endemici sono sensibilmente minori.

Gli animali infetti possono superare la patologia e non mostrare più segni clinici anche se questa evenienza è scarsamente documentata. Fattori predisponenti come affollamento, promiscuità elevata di animali della stessa età e scarsa qualità dell'aria

all'interno dei capannoni possono esacerbare la patologia (*Harding et al., 1998*).

Le lesioni anatomopatologiche riferibili a PMWS variano dal collasso polmonare ad aree di consolidazione del parenchima respiratorio localizzato alle aree cranio-ventrali che assumono un aspetto "carnoso". Solitamente nei suini affetti viene riscontrata una linfadenopatia sistemica marcatamente rappresentata a livello dei linfonodi inguinali, mesenterici, bronchiali e mediastinici che assumono un aspetto pallido e omogeneo sulla superficie di taglio. Generalmente nei linfonodi colpiti si nota la diminuzione dei follicoli linfatici (linfociti B) a favore delle zone paracorticali (linfociti T) che appaiono infiltrate di istiociti e cellule giganti. Dalle fasi iniziali a quelle intermedie della malattia si può riscontrare frequentemente, osservando i follicoli linfatici linfonodali, la presenza di corpi inclusi intracitoplasmatici di dimensioni variabili ed intensamente basofili localizzati all'interno dei linfociti B. Questi cambiamenti sono associati spesso a rilevante riscontro di antigene virale all'interno del citoplasma della cellule dendritiche.

Lesioni simili vengono osservate anche nella milza e nelle placche del Peyer. Il fegato, macroscopicamente appare ridotto in dimensioni e moderatamente itterico con abbondante tessuto

connettivo interlobulare. Le lesioni istologiche precoci comprendono infiltrazione linfo-istiocitaria delle zone periportali e necrosi epatocitaria. In fase finale della malattia i rimanenti epatociti appaiono ampiamente vacuolizzati in preda a cariomegalia e progressivo rimpiazzo di questi da parte di cellule istiocitarie. Antigeni di PCV-2 possono essere dimostrati precocemente all'interno del nucleo degli epatociti e con l'avanzare della patologia anche nel citoplasma delle cellule del Kupffer e delle cellule mononucleate infiltranti.

L'aspetto del rene appare variabile: da punteggiato con presenza di foci biancastri a livello corticale ed edema peripelvico a marcatamente ingrandito ed edematoso. Istologicamente si rilevano aree diffuse o multifocali di infiltrato linfo-istiocitario ed eosinofilo a livello del tessuto peripelvico che appare edematoso e desmoplastico. Vasculiti diffuse o multifocali sono inoltre un reperto frequente in sopradette aree.

Le lesioni corticali spaziano dall'atrofia multifocale tubulare alla necrosi dei tubuli associata ad edema, proliferazione fibrosa e nefrite interstiziale. Solitamente l'antigene virale, a livello renale viene riscontrato sia nelle pareti delle arterie glomerulari, sia in maniera maggiore nel citoplasma delle cellule epiteliali tubulari e dei

fagociti mononucleati. In caso di interessamento del tratto gastro-intestinale può comparire pallore, edema ed ulcerazioni non emorragiche della *pars-esofagea* dello stomaco e riduzione dello spessore delle pareti intestinali, soprattutto dell'ileo e del colon spirale, che risultano ripieni di liquido. Istologicamente troviamo atrofia dei villi intestinali con infiltrazione linfoistiocitaria transmurale. Antigeni di PCV-2 possono essere reperiti nelle cellule epiteliali della mucosa lesionata, nei fagociti all'interno della mucosa e sottomucosa nonché nei gangli linfatici intestinali. Sebbene a livello pancreatico, le lesioni macroscopiche sono un reperto non molto comune, in alcuni casi se ne riportano di multifocali, atrofiche o rigenerative, a livello dell'epitelio acinare e duttulare che sono spesso associate ad infiltrazione linfo-istiocitaria.

Esiste quindi una molteplicità di targets che il virus può avere, considerando gli organi sedi di danno sopraelencati.

Inoltre nella maggior parte dei casi le lesioni non coesistono e organi diversi possono risultare compromessi in animali diversi ma facenti comunque parte dello stesso allevamento. I fattori che determinano la molteplicità dell'interessamento organico non sono ancora ben chiari ma possono essere correlati alla presenza di infezioni secondarie (PRRSV, PPV, Pasteurella), differenze nella

virulenza di PCV-2, stadio dell'infezione, genotipo dell'animale infettato o tipo di risposta immunitaria.

Pochi anni dopo gli studi pionieristici effettuati in Canada sulla PMWS da Clark e Harding nel 1996 venivano riportati, in Europa e USA, molteplici casi di sindromi associate a deperimento dei suinetti allo svezzamento: in Spagna (*Alla net et al., 1999; Rossel et al., 1997; Segalès et al., 1997*) vennero descritte le lesioni macroscopiche ed istologiche della malattia, così come in Inghilterra (*Kennedy et al., 1998*), Irlanda (*Spillane et al., 1998*), USA (*Kuipel et al., 1998; Morozov et al., 1998*), Danimarca (*Allan et al., 1999*), Germania (*Hinrichs et al., 1999*), Olanda, Belgio ed Italia (*G. Allan, dati non pubblicati*). In tutti questi studi l'antigene virale o l'acido nucleico di PCV-2 fu dimostrato, solitamente in abbondanza, associato a lesioni microscopiche, e spesso fu possibile isolare il virus dai suini malati. Come precedentemente detto, sono state fatte ipotesi eziologiche sulla possibilità che la sindrome non dipenda solo da PCV-2 ma che risulti da una coinfezione con PRRSV, cosa che spiegherebbe la maggior gravità clinica dei soggetti PRRSV-positivi (*Ellis et al., 1999*). Seguendo questa linea di pensiero Ellis, Krakowka et al. dimostrarono la presenza di PCV-2 in 2 di 5 isolati di PRRSV provenienti da cinque diversi stati americani (*Ellis et al., 1999*). In un

recente studio, più del 60% dei casi diagnosticati come PMWS negli stati uniti centro-orientali risultarono essere infetti concomitantemente con PRRSV (*Sorden et al., 1998*).

In contrasto con questo studio, soltanto il 20% di suini diagnosticati positivi, in Canada, per PCV-2 risultarono positivi anche per PRRSV (*Ellis et al., 2000*). Questi dati, apparentemente discordi possono essere comunque il risultato dell'alta prevalenza che ha PRRSV nell'allevamento suino mondiale. Inoltre circa il 20% dei suini Canadesi infetti da PCV-2 furono trovati positivi per PPV (*Ellis et al., 2000*). Infezioni concomitanti con PCV-2 e PPV sono state riportate oltre che nel nuovo continente anche in Europa dove però più frequenti sono risultate essere le infezioni crociate con PRRSV e morbo di Aujeszky. Se PCV-2 sia quindi un agente immunosoppressivo nelle infezioni crociate rimane ancora da stabilire.

In recenti casi di aborto associati a PCV-2 in Canada, i feti mostravano variabile dilatazione miocardica e miocarditi associate ad abbondante presenza di antigene virale nei miocardiociti (*West et al., 1999*). In conclusione pertanto la recente associazione tra PMWS, casi di aborto e lesioni fetali suggerisce la possibilità di

inserire questa patologia nella diagnosi differenziale dei disordini riproduttivi del suino.

Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome

Il nome “Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome” (PDNS) fu utilizzato per la prima volta da Smith et al. (*Smith et al., 1993*) per descrivere un apparentemente nuovo quadro morboso distinguibile dalle altre affezioni che colpiscono il suino in Inghilterra. Questa condizione patologica colpiva suini di peso compreso tra i 40 kg e i 70 kg ed era alquanto sporadica con una prevalenza totale dell’ 1% circa. La nuova patologia era caratterizzata da lesioni della cute e del rene che appariva pallido, ingrandito con presenza di petecchie corticali diffuse.

I riscontri microscopici più frequenti risultavano infatti essere la glomerulonefrite acuta e le vasculiti necrotizzanti.

Casi simili alla patologia descritta da Smith nel 1993 venivano rilevati successivamente anche in altri paesi come il Canada (*Helie et al., 1995*), il Sud Africa (*Van Halderen et al., 1995*), la Spagna (*Segalès et al., 1996*), gli USA (*Ramos-Vara et al., 1997*), il Cile (*Sierra e De Las Mulas, 1997*), la Francia (*Solignac 1997*), l’Olanda (*Sierra e De Las Mulas, 1997*), l’Italia (*Guarda 2001*) e l’Argentina (*Machuca et al., 1999*).

Si discute ancora a riguardo dell'eziologia della malattia, anche se negli ultimi anni, la continua repertazione di antigene virale e DNA di PCV-2 a livello delle lesioni, depongono a favore di questo virus come agente causale. Ipotesi simili invece riconoscono l'associazione di PCV-2 alla patologia ma non identificano il virus come agente eziologico esclusivo del quadro morboso associando quest'ultimo ad infezioni da PRRSV, *Pasteurella Multocida* e *Streptococcus sp.* .

La PDNS solitamente colpisce suinetti, suini giovani e sporadicamente animali adulti (*Drolet et al., 1999*). La prevalenza della sindrome negli allevamenti affetti, come accennato sopra, è relativamente bassa, risultando essere minore dell'1% (solitamente dallo 0,05% allo 0,5%) (*Segalès et al., 1998*).

Recentemente una percentuale più alta è stata descritta in Inghilterra con un riscontro di mortalità altamente variabile dallo 0,25% al 20% degli allevamenti affetti così come in Spagna dove questa si è attestata intorno al 10%.

I soggetti affetti da PDNS mostrano anoressia, depressione, prostrazione, riluttanza al movimento e moderata ipertermia.

In ogni caso, il segno clinico patognomonico di questa patologia risulta essere, in fase acuta, la presenza di macule e papule

cutanee di colorazione variabile dal rosso al porpora, localizzate soprattutto alle regioni perineali e agli arti posteriori, spesso coalescenti o addirittura generalizzate negli animali più gravemente infetti. Con il progredire della malattia, le lesioni cutanee si coprono di croste scure e cadono gradualmente, spesso lasciando cicatrici (*Drolet et al., 1999*).

Alla necropsia, i reni, i polmoni ed i linfonodi risultano essere gli organi maggiormente colpiti da lesioni.

Entrambi i reni infatti sono ingranditi, pallidi e punteggiati di emorragie petecchiali corticali.

I polmoni solitamente non presentano aree collassate e qualche volta si può osservare una polmonite suppurativa.

I linfonodi infine sono ingranditi e di colore rosso scuro; questo ultimo aspetto solitamente è confinato ai seni midollari e sottocapsulari, il che suggerisce un' imbibizione emorragica piuttosto che emorragie vere e proprie.

Altre lesioni macroscopiche associate a PDNS includono effusioni sierose nelle cavità e abbondante incremento di liquido sinoviale (*Drolet et al., 1999*). In alcuni casi sono state osservate necrosi focali o estensive della milza (infarti splenici).

PDNS quindi è facilmente svelabile dai sintomi clinici e dalle lesioni anatomopatologiche anche se indagini istologiche sono necessarie per una precisa diagnosi della malattia.

Su sezione di vari organi colorate con Ematossilina-Eosina i reperti più significativi sono infatti la presenza di glomerulonefriti crescentiche e vasculiti necrotiche sistemiche.

Gli spazi glomerulari contengono solitamente precipitati di fibrina, granulociti neutrofili ed eritrociti.

Nella maggior parte dei casi acuti di malattia, è colpito il 100% dei glomeruli in entrambi i reni. In tutti questi casi, gli animali mostrano alti livelli di creatinina ed urea dopo analisi del sangue, dato che suggerisce come causa di morte più frequente, l'insufficienza renale.

In suini affetti cronicamente invece si rileva fibrosi interstiziale renale e sclerosi glomerulare.

Le vasculiti necrotizzanti invece vengono osservate in una varietà di organi che includono il rene (soprattutto a livello della pelvi ma interessanti anche le arterie glomerulari), le sierose, i linfonodi, la milza, i polmoni, il fegato, il cuore, la vescica, le meningi e naturalmente il derma (responsabili di ischemia e necrosi che inducono le lesioni macroscopiche caratteristiche).

I vasi colpiti sono solitamente le arterie di piccolo-medio calibro così come i capillari (soprattutto a livello dermico) che vengono affetti da necrosi fibrinoide della tonaca intima e media.

Oltre a queste lesioni, si osserva in tutti i casi di PDNS una deplezione linfocitaria massiva a livello linfonodale.

Nel 50 % circa dei suini affetti si osserva anche, nel parenchima linfonodale, infiltrato consistente in istiociti e cellule giganti multinucleate che si localizzano soprattutto all'interno delle aree follicolari. Un'altra lesione istologica molto rappresentata negli animali colpiti da PDNS (circa 80% dei casi) è una polmonite interstiziale di gravità variabile con edema e congestione del parenchima polmonare.

Patogenesi della PDNS

Sin dai primi studi effettuati nel 1993 da Smith et al. sulla PDNS, le lesioni microscopiche della malattia suggerivano una patologia mediata da immunocomplessi. La teoria patogenetica ipotizzata è stata provata successivamente tramite due studi, datati 1995 e 1997 (*Helie et al., 1995; Sierra e De Las Mulas, 1997*), in cui venivano ritrovati, a livello dei glomeruli renali e dei vasi affetti da necrosi fibrinoide, depositi, spesso consistenti di IgM, IgA ed IgG (meno frequenti) nonché delle frazioni C3 e C1q del sistema complemento.

In ogni caso gli immuno-complessi erano composti da immunoreagenti (immunoglobuline e frazioni del complemento) ma anche da componenti antigeniche. La natura di queste componenti antigeniche è tuttora sconosciuta anche se diverse ipotesi eziologiche sono state fatte. Teoricamente infatti la patologia potrebbe essere innescata da una miriade di fattori tra cui farmaci, agenti chimici di varia natura, allergeni alimentari, antigeni endogeni e una serie di agenti infettivi (*Thomson e Lainson, 1998*).

In particolare, antigeni di agenti infettivi presumibilmente implicati nella patogenesi di PDNS vengono riscontrati regolarmente a livello delle lesioni e tra i più rappresentati troviamo: PRRSV, Pasteurella Multocida, Streptococcus sp. e lipopolisaccaridi di batteri gram-negativi. Con il progredire delle tecniche diagnostiche d'altra parte si è notato la costante presenza di antigene di PCV-2 che secondo le teorie più recenti (compreso questo studio) può venire considerato il vero agente causale di questa patologia, anche se le vere manifestazioni cliniche possono derivare dalla sinergia di tutti gli agenti infettivi sopramenzionati.

1.5 Diagnosi

Attualmente la dimostrazione di anticorpi sierici diretti verso PCV-1 o PCV-2 può essere raggiunta tramite tecniche di immunofluorescenza indiretta (IFI) o test di immunoperossidasi indiretta (IPI) (*Allan et al., 1998; Ellis et al., 1998*). Deve essere posta molta attenzione nell'interpretazione dei risultati per l'alta affinità antigenica tra PCV-1 e PCV-2. Gli autori di uno studio in merito (*Allan et al., 1998*) raccomandano infatti diluizioni 1/10, 1/100 e 1/1000 dell'anticorpo coniugato per testare i sieri in analisi in modo da interpretare più facilmente i dati e non rischiare di cadere in errori di reazioni crociate tra i due agenti infettivi.

Un kit ELISA specifico per PCV-2 è stato prodotto recentemente ed è disponibile a tutt'oggi per analisi sierologiche rapide ed efficaci (*Ellis, Allan dati non pubblicati*), anche se in ogni caso il ritrovamento di anticorpi anti-PCV-2 in suini non è significativo di patologia in atto ma deve sempre essere affiancato ai dati clinici e alla dimostrazione delle lesioni associata alla presenza di antigene virale o acido nucleico.

La costante emergenza di una serie di condizioni cliniche e di sindromi nel suino oggi associate a PCV-2 e precedentemente

descritte come casi anomali di PRRS, suggerisce sicuramente che PCV-2 dovrebbe essere considerato di routine nelle diagnosi differenziali sintomatologiche in allevamento suino.

Per facilitare le operazioni di screening degli allevamenti sono stati prodotti pannelli di anticorpi monoclonali (Mabs) diretti verso PCV-1 e PCV-2 (*Allan et al., 1994; 1999*), che possono essere utilizzati su strisci cellulari preventivamente fissati in acetone, sezioni criostatiche, tessuti fissati in formalina, tessuti inclusi in paraffina o colture cellulari (*Allan et al., 1994*).

E' stato riportato in letteratura anche l'utilizzo dell'ibridazione *in situ* come tecnica diagnostica applicabile nella ricerca di PCV-2 (*Choi e Chae, 1999; Kuipel et al., 1998*) e PRRSV (*West et al., 1999*) da tessuti di animali infetti.

E' stata fatta inoltre una comparazione tra tecniche immunoistochimiche e l'ibridazione *in situ* per la ricerca di antigeni di PCV-2 in tessuti inclusi in formalina, determinando una maggior sensibilità della tecnica immunoistochimica (*McNeilly et al., 1999*).

Sono state poi descritte diverse tecniche basate sulla *Polymerase Chain Reaction* (PCR) per l'identificazione di materiale nucleico di PCV-1 e PCV-2 e la diagnosi delle malattie correlate a questi.

Comunque l'uso di questo test diagnostico può essere problematico e molto indaginoso.

La sensibilità molto alta della tecnica PCR può essere utilizzata con buoni risultati allorché si debba ricercare quantità minime di antigene virale nei tessuti in analisi.

Proprio l'alto grado di sensibilità mostrato da questo test ne sconsiglia però l'uso nella diagnostica degli allevamenti.

PCV-1 è infatti endemico ormai nella popolazione mondiale di suini, cosa che non depone a favore della tecnica PCR che non può ancora bene discernere la sottile differenza che c'è tra le sequenze genomiche di PCV-1 e PCV-2.

Infine deve essere fatta molta attenzione nei laboratori che utilizzano questa tecnica alle contaminazioni crociate che spesso provengono proprio dagli allevamenti al momento dell'autopsia dove i tessuti vengono contaminati.

Pertanto la diagnosi di malattie associate a PCVs deve essere fatta cercando di utilizzare al meglio ed in sinergia le tecniche sopradescritte basandosi comunque sempre sulla clinica e sulle lesioni anatomopatologiche.

Il rilevamento comunque delle caratteristiche lesioni contenenti PCV-2 in uno o più organi associate ad un'anamnesi collettiva

approfondita ed ai segni clinici caratteristici possono con buona approssimazione portarci alla diagnosi di Malattie correlate a PCVs.

CAPITOLO 2

IL CIRCOVIRUS NEL CINGHIALE

La presenza di circovirus tipo 2 è stata dimostrata, così come nel suino anche nel cinghiale (*Sus scrofa*) tramite indagini sierologiche (*Tischer et al., 1986; Sanchez et al., 2001; Segalés et al., 2002; Ellis et al., 2003; Schulze et al., 2003; Vicente et al., 2004*) o metodi diretti (*Segalés et al., 2003; Schulze et al., 2003; Exel et al., 2004*).

In questa specie la positività all'antigene virale non era mai stata associata a manifestazioni patologiche evidenti, finché, di recente, Schulze (2003) ha descritto in Germania il primo caso di infezione da PCV-2 accompagnato a lesioni morfologiche caratteristiche nella sindrome da deperimento post-svezzamento (PMWS).

L'esemplare descritto nello studio era un maschio di circa 10 mesi di età, rinvenuto morto con evidenti condizioni di deperimento organico generalizzato rinvenute in sede di esame autoptico. L'esame istologico ha rilevato deplezione linfocitaria in diversi organi linfoidi, in particolare a carico della polpa bianca della milza dove si osservava la presenza di qualche cellula multinucleata ed una modesta infiltrazione linfocitaria.

Inoltre lesioni variamente distribuite indicavano una setticemia batterica, caratterizzata da linfadenite purulenta multifocale, necrosi miliare epatica e foci multipli di polmonite fibrinosa. La presenza dell'antigene virale è stata rilevata attraverso metodiche di immunofluorescenza.

L'età approssimativa di 40 settimane risulta più elevata dell'età media dei suinetti affetti da PMWS, i quali vengono colpiti in genere tra le 5 e le 12 settimane: ad oggi non è possibile stabilire le ragioni di tale differenza nell'espressione della sindrome anche se, presumibilmente, le diverse condizioni di vita, l'età del contagio, la gravità della infezione e le caratteristiche di resistenza della specie modificano l'evoluzione della sindrome sostenuta da PCV-2.

Nel suino, sia l'attivazione aspecifica del sistema immunitario (*Krakowa et al., 2001*), che la concomitante presenza di altri patogeni (*Pallares et al., 2002*), sono stati identificati come fattori determinanti la manifestazione della PMWS (*Segalés e Domingo 2002*).

Anche nel cinghiale, in base ai dati in nostro possesso, la patogenesi della malattia dovrebbe seguire lo stesso corso: in questa specie la sindrome si esprime quando la presenza del virus è associata ad infezioni secondarie, come patologie respiratorie

sostenute da *Pasteurella sp.* o infezioni genitali sostenute da *Candida albicans*. (Zlotowski et al. 2006)

Tali considerazioni pongono sicuramente l'attenzione sulla caratterizzazione del PCV-2 del cinghiale e sul ruolo di questo nell'epidemiologia della virosi.

Per quanto riguarda la caratterizzazione, gli studi di Ellis (2003) suggeriscono la presenza di un solo PCV-2 capace di contagiare entrambe le specie, data l'elevata omologia, circa 98,7%, tra gli ORF2 (open readings frame) di PCV-2 di cinghiale e quelli individuati per il suino. Questa affermazione trova conferma anche nelle indagini di Schulze (2004) che individuano una corrispondenza pressoché identica tra le sequenze genetiche di PCV-2 isolati nelle due specie; allo stesso modo Csagola (2006), nell'ambito di una ricerca sulla circovirosi nei cinghiali in Ungheria, dimostra un'alta similarità genomica tra il responsabile della patologia nel suino e nel cinghiale.

L'epidemiologia della virosi e il ruolo delle due specie non sono ancora chiari. Il cinghiale dimostra una notevole resistenza al virus e raramente alla positività segue lo sviluppo dei sintomi; la stessa risposta si ha in patologie come il morbo di Aujeszky e la peste suina classica, per le quali è considerato reservoir (Albina et al.,

2000; Laddomada 2000). Tutto ciò ci fa supporre che il cinghiale rappresenti un serbatoio anche nella propagazione di PCV.

Gli studi effettuati sui cinghiali confermano, infatti, una notevole diffusione del virus nelle regioni sondate con valori tra il 20 e il 50 % (Csagola et al., 2006; Vicente et al., 2004), ma la segnalazione di PMWS resta casuale (Vicente et al., 2004). Diversamente nei soggetti allevati si ha notizia di varie epidemie di PMWS associate ad un numero di positivi sicuramente più significativo, tra l'80 ed il 100%, e ad un grado di mortalità infantile molto alta (Mari et al., dati non pubblicati). Tali osservazioni sono state più evidenti negli allevamenti con alta densità di capi e scarse condizioni igieniche (Vicente et al., 2004) dove si ha una risposta al virus simile a quella rilevata nel suino probabilmente per l'elevato stress a cui gli animali sono sottoposti.

La divergenza tra i dati può essere giustificata dalla presenza più o meno radicata del cinghiale nel territorio: nelle zone dove si ha un elevato numero di capi la presenza del circovirus è difatti più marcata. Negli allevamenti invece si ha una risposta al virus simile a quella del suino probabilmente per l'elevato stress a carico del sistema immunitario a cui gli animali sono sottoposti.

La progressiva crescita della popolazione di cinghiale, di fatto l'ungulato selvatico maggiormente presente nella penisola, e la diffusione della pratica di allevamento di questi animali, anche a scopo di ripopolamento, possono rappresentare un background ottimale per il mantenimento e la diffusione di circovirus ostacolando gli eventuali sforzi di circoscrizione ed eradicazione dell'infezione.

CAPITOLO 3

OBIETTIVO DELLA TESI

Il Circovirus tipo II è conosciuto come agente causale della sindrome multisistemica da deperimento post svezzamento (PMWS). Tale sindrome, che si manifesta con perdita di peso e lesioni varie nei suinetti appena svezzati, è nota come una delle patologie che influenzano di più lo stato sanitario ed i profitti delle aziende del settore (*Allan and Ellis 2000*).

Questa tesi si pone come obiettivo principale la determinazione della prevalenza e della diffusione di PCV 2 nella popolazione di cinghiale europeo delle Province di Pisa e Grosseto. Le due province scelte per l'indagine, presentano delle caratteristiche pedoclimatiche comuni che rendono possibile il confronto dei risultati. Entrambe difatti possono vantare vaste aree boschive con sottoboschi molto fitti, presenza di corsi d'acqua, clima mite ed altitudine modesta. Tali aspetti hanno permesso un insediamento stabile del cinghiale europeo e ciò ha reso più frequente il contatto con il suino domestico e brado, amplificando così la diffusione di PCV-2.

Come ulteriore obiettivo si è cercato di chiarire il ruolo che il cinghiale riveste nella diffusione della virosi.

La funzione di reservoir è ormai stata appurata in patologie ben conosciute nell'allevamento suino, come il morbo di Aujeszky (AD), la peste suina classica (CSF) e la sindrome respiratoria riproduttiva (PRRSV) (*Vicente et al., 2002; Zupancic et al., 2002*). Abbiamo analizzato vari organi per mezzo di indagini istopatologiche e di immunofluorescenza al fine di evidenziare lesioni caratteristiche per PCV-2 e la presenza dell'antigene virale e stabilire il grado di coinvolgimento sistematico degli esemplari in oggetto e individuare il compito che essi svolgono nell'epidemiologia del virus.

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

4.1 Raccolta dei campioni

Nel periodo tra novembre 2005 e gennaio 2006 sono state esaminate le carcasse di 92 esemplari di cinghiale abbattuti, durante la regolare attività venatoria, nell'Ambito Territoriale di Caccia (ATC 14 e 15) della provincia di Pisa.

Al termine della battuta di caccia sono stati prelevati campioni di tessuto tonsillare, linfonodale (proveniente dai linfonodi retromandibolari ed inguinali), polmonare, testicolare, prostatico ed uterino. Sono state inoltre raccolte informazioni sulla provenienza, il sesso e l'età di ciascun animale.

Dei 92 animali campionati 58 erano maschi e 34 femmine, 26 di questi erano inferiori ad un anno di età e 58 erano superiori ad un anno. I campioni sono stati fissati in formalina tamponata in attesa di effettuare le analisi.

I dati relativi alla provenienza, età, sesso e zona di abbattimento degli animali esaminati sono riportati nell'allegato I.

I dati relativi ai visceri campionati per ognuno dei 92 cinghiali della provincia di Pisa sono riportati nell' allegato II.

Analogamente è stata avviata un'indagine retrospettiva su 54 campioni di tessuti di cinghiale inclusi in paraffina, provenienti dall' ATC 7 della provincia di Grosseto abbattuti durante la stagione venatoria 2002-2003.

I campioni provenienti dalla provincia di Grosseto sono stati altresì suddivisi in base al sesso e all'età. Dei 54 animali 23 erano maschi e 31 femmine, 16 animali erano inferiori ad un anno di età e 38 erano superiori ad un anno.

I dati relativi alla provenienza, zona di abbattimento, età e sesso sono riportati in allegato III.

Nell'allegato IV sono riportati i dati relativi ai visceri campionati per i cinghiali della provincia di Grosseto.

La scelta di selezionare questi campioni da un gruppo più numeroso si è basata sulla posizione geografica delle zone di abbattimento, sono stati, infatti, privilegiati quei siti che risultavano prossimi ad allevamenti, intensivi o estensivi, di suini, in modo da poter indagare il ruolo di reservoir o di veicolo del cinghiale. Si ritiene difatti che presumibilmente la positività sia maggiore tra quegli animali che hanno la possibilità di entrare in contatto con i suini.

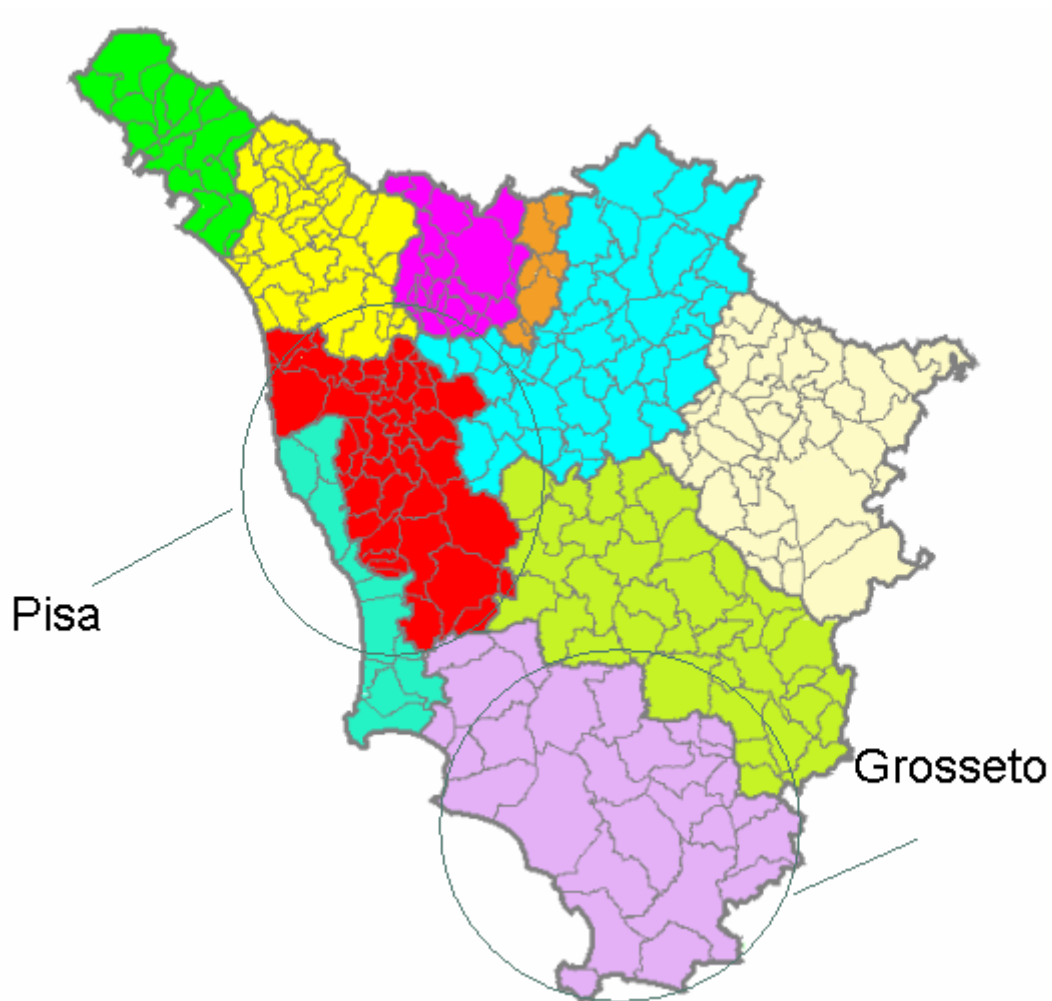


Figura 1. Cartina della Toscana, nelle aree evidenziate le Province studiate.

4.2 Indagini istopatologiche e istochimiche

Porzioni rappresentative degli organi prelevati sono state fissate in formalina tamponata al 10% a pH 7,4 e successivamente incluse in paraffina seguendo le normali metodiche.

Sezioni di 4 μm di spessore sono state colorate con Ematossilina-Eosina (E-E) per le visioni generali.

Sulle stesse sezioni sono state effettuate colorazioni specifiche per evidenziare la presenza di miceti (PAS e Grocott) e batteri alcool-acido resistenti (Ziehl-Neelsen).

4.3 Indagini di immunofluorescenza

La presenza di antigeni virali di PCV-2 è stata indagata mediante immunofluorescenza diretta su sezioni incluse in paraffina dello spessore di 4 μm . Le sezioni sono state sparaffinate mediante passaggio in xilolo.

Dopo un lavaggio con un tampone PBS sono state incubate per 30 minuti in camera umida con 50-75 μl di anticorpo policlonale primario coniugato a fluoresceina isotiocianato di origine suina diretto contro PCV-2 (VMRD, Inc Pullman., WA., USA).

Dopo l'incubazione si è proceduto al risciacquo con soluzione Fa Rinse Buffer a pH 9.0 (VMRD n° catalogo 210-90-RB).

E' stata fatta quindi allontanare la soluzione a pH 9.0 in eccesso mediante sgocciolatura senza permettere che i campioni si asciugassero completamente.

Infine i vetrini sono stati montati con una soluzione di Glicerolo ed Fa Rinse Buffer pH 9.0, 50/50, quindi osservati al microscopio a fluorescenza. In ogni esperimento come controllo positivo sono state utilizzate delle sezioni di rene suino naturalmente infetto con PCV-2 e affetto da nefrite interstiziale. I dati ottenuti sono stati trattati statisticamente con un test χ^2 assumendo come significatività $p > 0,05$.

CAPITOLO 5

RISULTATI

Indagini istopatologiche

I risultati relativi alle indagini istopatologiche sono riportati nelle tabelle seguenti.

RISULTATI GROSSETO

Nella tabella n°1 vengono presentati i dati relativi alle lesioni polmonari osservate nei 48 casi esaminati.

Tabella 1. Lesioni polmonari rilevate nei campioni di polmone esaminati

| Tipo di lesione | Risultati |
|------------------------------------|--------------------|
| Polmoniti parassitarie | 19/48 (40%) |
| Polmoniti interstiziali | 7/48 (15%) |
| Polmoniti a cellule giganti | 1/48 (2%) |
| Assenza di lesioni | 21/48 (44%) |

Nel 40% dei soggetti sono state identificate lesioni polmonari caratterizzate da bronchiti parassitarie (Figura 2-3) nelle quali si rilevava la localizzazione dei parassiti, iperplasia della muscolatura liscia dei piccoli bronchi e noduli parenchimali con infiltrato eosinofilo e macrofagico attorno ai residui di larve del parassita (Figura 4). Una tipizzazione dei parassiti adulti prelevati direttamente dall'albero respiratorio ha permesso di classificarli come *Metastrongylus apri*.

Il 14% dei soggetti (7/48) presentavano una polmonite interstiziale caratterizzata da un infiltrato linfocitario e macrofagico.

In 1 soggetto (2%) era presente una polmonite interstiziale con cellule giganti e nel 43% dei soggetti non sono state rilevate lesioni polmonari.

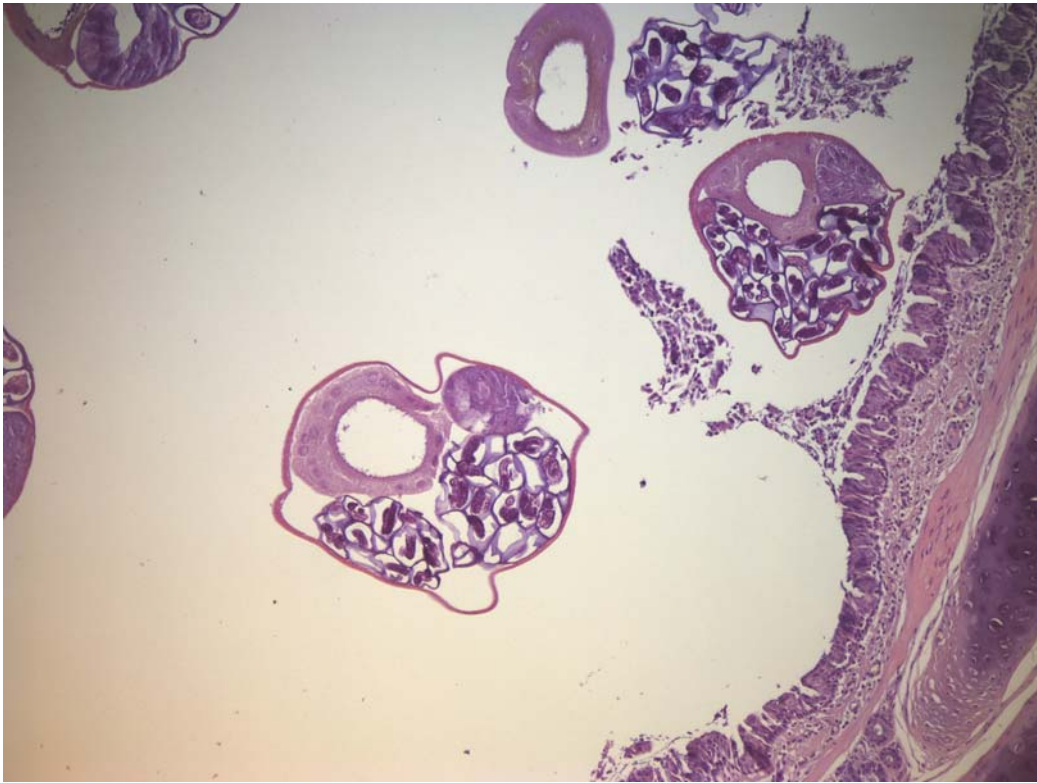


Figura 2. Polmone, Strongili in un grosso bronco; E-E, ob. 10x

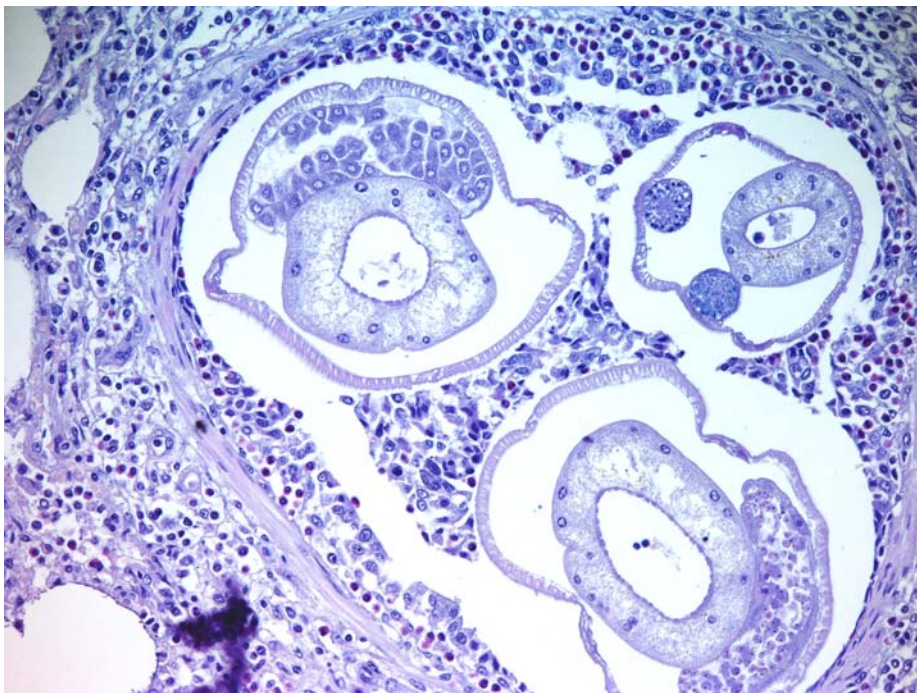


Figura 3. Polmone, polmonite parassitaria con parassiti adulti nei piccoli bronchi; E-E, ob. 25x

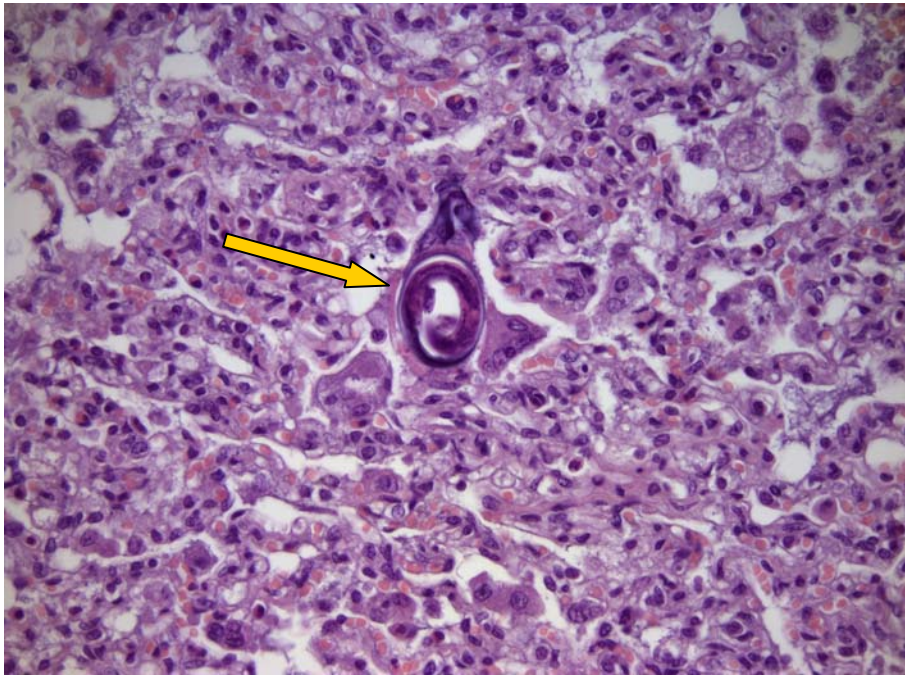


Figura 4. Polmone, larva di *Metastrongylus apri* nel parenchima polmonare; E-E, ob. 25x

Nella tabella n°2 vengono presentati i dati relativi alle lesioni spleniche osservate nei 41 casi esaminati.

Tabella 2. Lesioni della milza rilevate nei campioni esaminati

| Tipo di lesione | Risultati |
|---------------------------|--------------------|
| Iperplasia | 16/41 (39%) |
| Deplezione | 12/41 (30%) |
| Eosinofilia | 6/41 (15%) |
| Emosiderosi | 3/41 (7%) |
| Assenza di lesioni | 4/41 (10%) |

L'iperplasia della polpa bianca è stata rilevata nel 40% dei casi, la deplezione nel 30% circa, mentre il 15% dei soggetti presentavano una marcata eosinofilia e il 7% emosiderosi.

Nella tabella n°3 vengono presentati i dati relativi alle lesioni linfonodali osservate nei 52 casi esaminati.

Tabella 3. Lesioni linfonodali rilevate nei campioni esaminati

| Tipo di lesione | Risultati |
|------------------------|--------------------|
| Iperplasia | 19/52 (36%) |
| Deplezione | 17/52 (31%) |
| Eosinofilia | 16/52 (31%) |

Nel 36% dei soggetti si rileva una marcata iperplasia dei follicoli linfatici con la presenza di follicoli secondari, nel 31% dei casi è stata osservata una deplezione follicolare (Figura 5) e nel 31% eosinofilia.

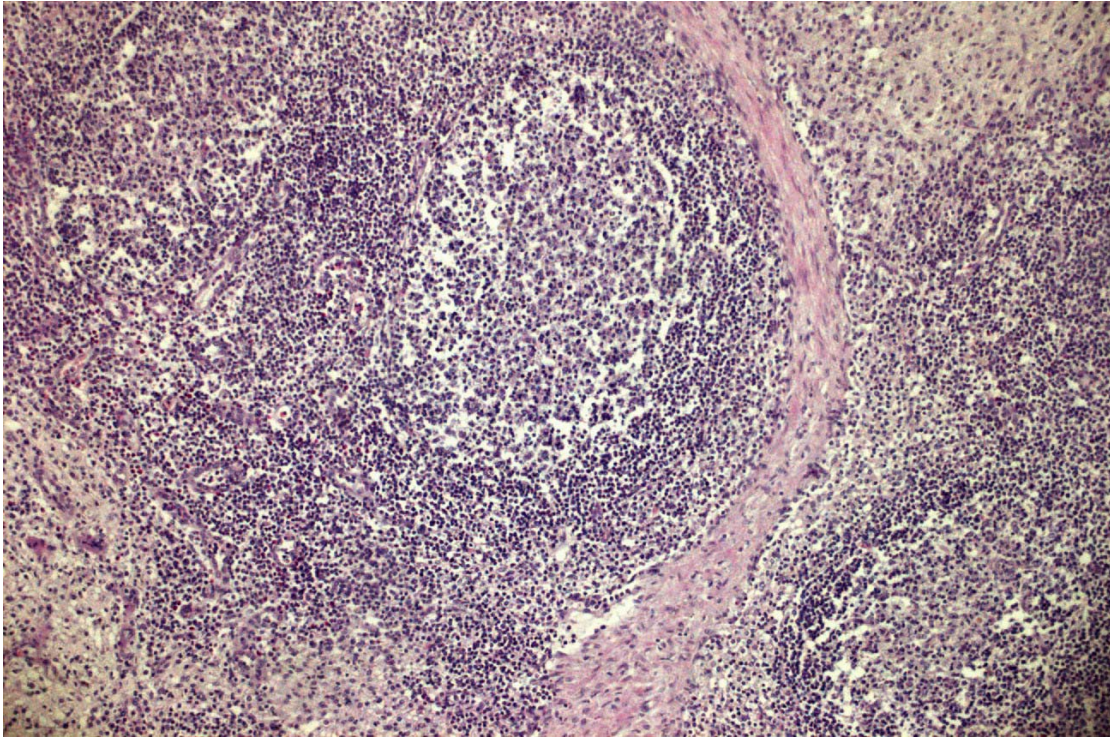


Figura 5. Linfonodo, evidente deplezione del follicolo linfatico;

E-E, ob. 25x.

Nella tabella n°4 vengono presentati i dati relativi alle lesioni tonsillari osservate nei 52 casi esaminati.

Tabella 4. Lesioni delle tonsille rilevate nei campioni esaminati.

| Tipo di lesione | Risultati |
|---------------------------------|--------------------|
| Tonsillite necrotica 1+ | 23/52 (44%) |
| Tonsillite necrotica 2+ | 17/52 (33%) |
| Tonsillite necrotica 3+ | 2/52 (4 %) |
| Tonsillite batterica | 3/52 (6 %) |
| Tonsillite granulomatosa | 1/52 (2%) |
| Assenza di lesioni | 6/52 (11%) |

In 44 casi dei 52 esaminati sono state osservate forme di tonsillite necrotica, queste sono state classificate in base alla gravità considerando la diffusione delle aree necrotiche. Nel 44% dei casi sono risultate di forma lieve, nel 32% moderata e nel 4% grave. Il 5% dei soggetti presentava una tonsillite batterica e in 1 dei 52 casi esaminati (2%) ad eziologia actinobacillare.

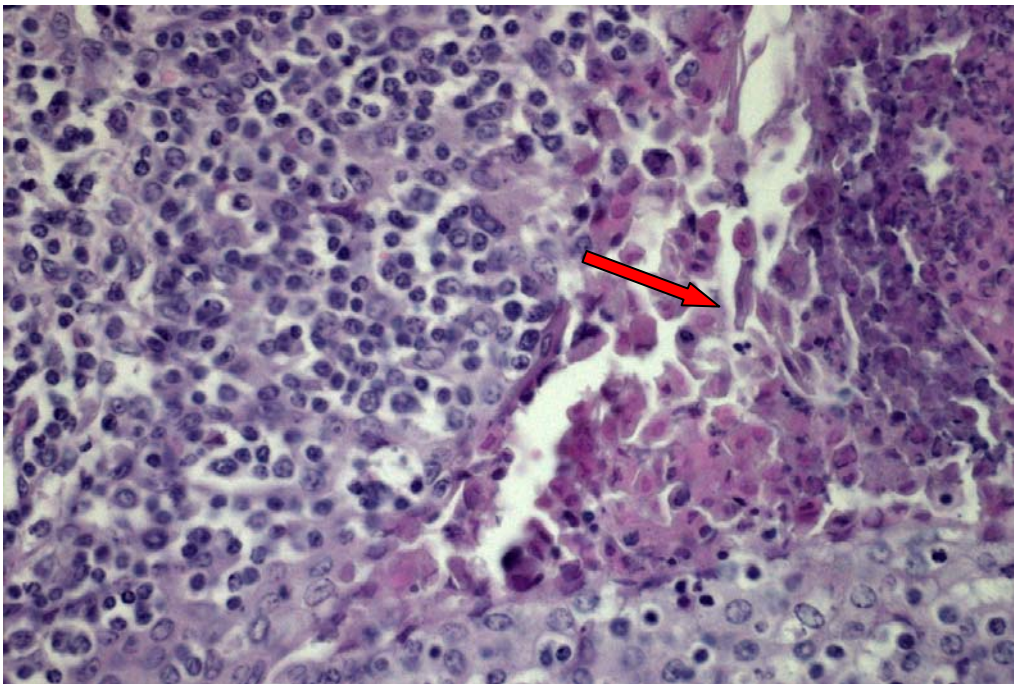


Figura 6. Tonsilla, ampie aree necrotiche nel parenchima tonsillare;
E-E, ob. 40x.

Nella tabella n°5 vengono riportati i dati relativi alle lesioni renali osservate nei 46 casi esaminati.

Tabella 5. Lesioni renali rilevate nei campioni esaminati

| Tipo di lesione | Risultati |
|------------------------------|----------------------|
| Glomerulo nefrite 1+ | 15/46 (32,6%) |
| Glomerulo nefrite 2+ | 3/46 (6,5%) |
| Nefrite interstiziale | 1/46 (2%) |
| Niente da rilevare | 27/46 (58,7%) |

Nel 60% dei casi (27/46) non sono state osservate lesioni renali.

Nel 39% dei soggetti si evidenziavano forme di glomerulo nefriti, lievi nel 33% dei casi, moderate nel 6% e soltanto in un soggetto è stata evidenziata nefrite interstiziale.

RISULTATI PISA

Nella tabella n°6 vengono presentati i dati relativi alle lesioni polmonari osservate nei 70 casi esaminati.

Tabella 6. Lesioni polmonari rilevate nei campioni di polmone esaminati

| Tipo di lesione | Risultati |
|------------------------------------|--------------------|
| Polmoniti parassitarie | 25/70 (36%) |
| Polmoniti interstiziali | 6/70 (9%) |
| Polmoniti a cellule giganti | 2/70 (3%) |
| Assenza di lesioni | 37/70 (53%) |

Nel 53% dei casi non si sono osservate lesioni a carico del tessuto polmonare mentre nel 36% dei soggetti si sono evidenziate bronchiti parassitarie caratterizzate dalla presenza del parassita allo stadio sia di larva sia di adulto. A carico della muscolatura liscia dei piccoli bronchi si evidenzia una iperplasia cellulare accompagnata da noduli parenchimali ed infiltrato eosinofilico e macrofagico attorno ai residui di larve del parassita.

I parassiti sono stati tipizzati e classificati come *Metastrongylus apri*.

Il 9% dei soggetti (6/70) presentava una polmonite interstiziale caratterizzata da un infiltrato linfocitario e macrofagico.

In 2 soggetti (3%) era presente una polmonite interstiziale con cellule giganti.

Nella tabella n°7 vengono presentati i dati relativi alle lesioni linfonodali osservate negli 84 casi esaminati.

Tabella 7. Lesioni dei linfonodi rilevate nei campioni esaminati

| Tipo di lesione | Risultati |
|------------------------|--------------------|
| Iperplasia | 33/84 (39%) |
| Deplezione | 32/84 (38%) |
| Eosinofilia | 19/84 (23%) |

Il tessuto linfoide è risultato interessato da lesioni varie, in particolare a carico dei follicoli si è potuto apprezzare una marcata iperplasia nel 39 % dei soggetti (Figura 7) e nel 38 % una deplezione del centro germinativo.

Infine nel 23 % dei tessuti abbiamo osservato una eosinofilia diffusa.

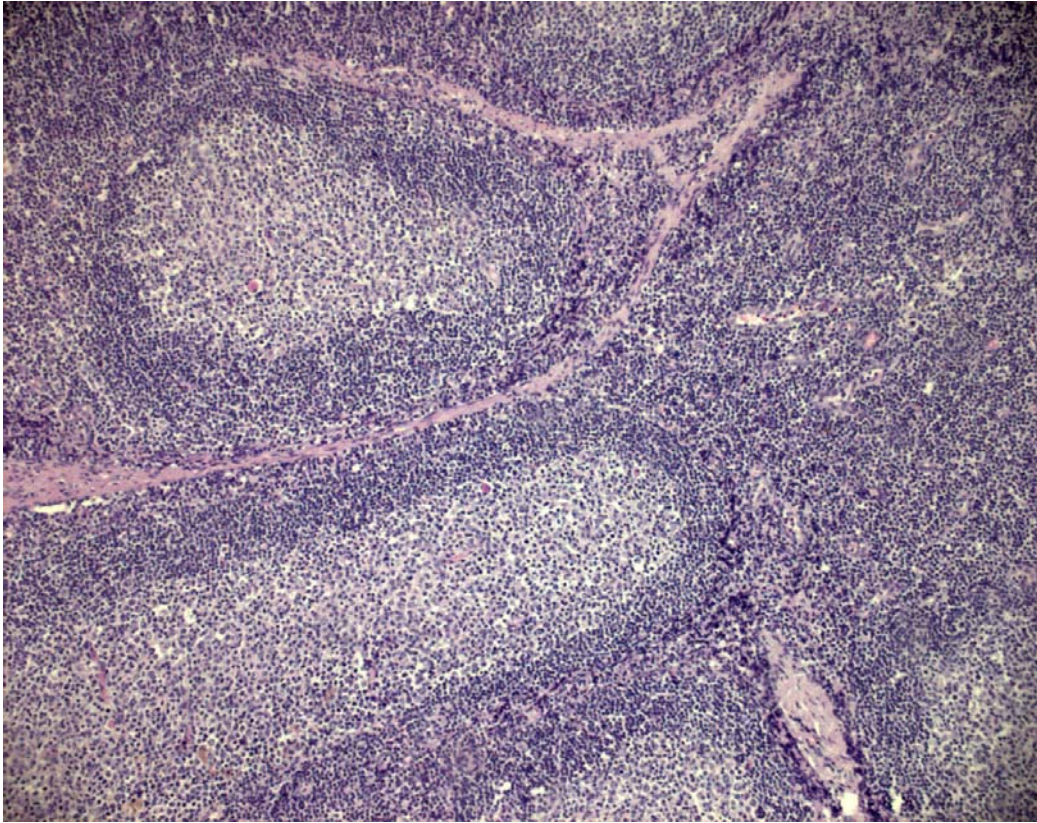


Figura 7. Linfonodo, iperplasia a carico dei follicoli linfatici;

E-E, ob.25x

Nella tabella n°8 vengono presentati i dati relativi alle lesioni tonsillari osservate nei 76 casi esaminati.

Tabella 8. Lesioni delle tonsille rilevate nei campioni esaminati

| Tipo di lesione | Risultati |
|---------------------------------|--------------------|
| Tonsillite necrotica 1+ | 32/76 (42%) |
| Tonsillite necrotica 2+ | 26/76 (34%) |
| Tonsillite necrotica 3+ | 3/76 (4%) |
| Tonsillite batterica | 7/76 (9%) |
| Tonsillite Granulomatosa | 1/76 (1%) |
| Assenza di lesioni | 7/76 (9%) |

Delle 76 tonsille esaminate 61 (80%) erano contraddistinte da forme di tonsillite necrotica, nel 42% dei casi lieve, nel 34% moderata e nel 4% grave. Il 9% dei soggetti presentava una tonsillite batterica e in uno dei 76 casi esaminati (1%) ad eziologia actinobacillare.

Indagini istochimiche

Gli studi condotti sugli organi a nostra disposizione non hanno messo in evidenza alcun dato di rilievo. In entrambe le Province le indagini con colorazioni specifiche, quali PAS e Grocott e Zhiel-Nielsen, non hanno riportato alcuna presenza di miceti o batteri alcool-acido resistenti.

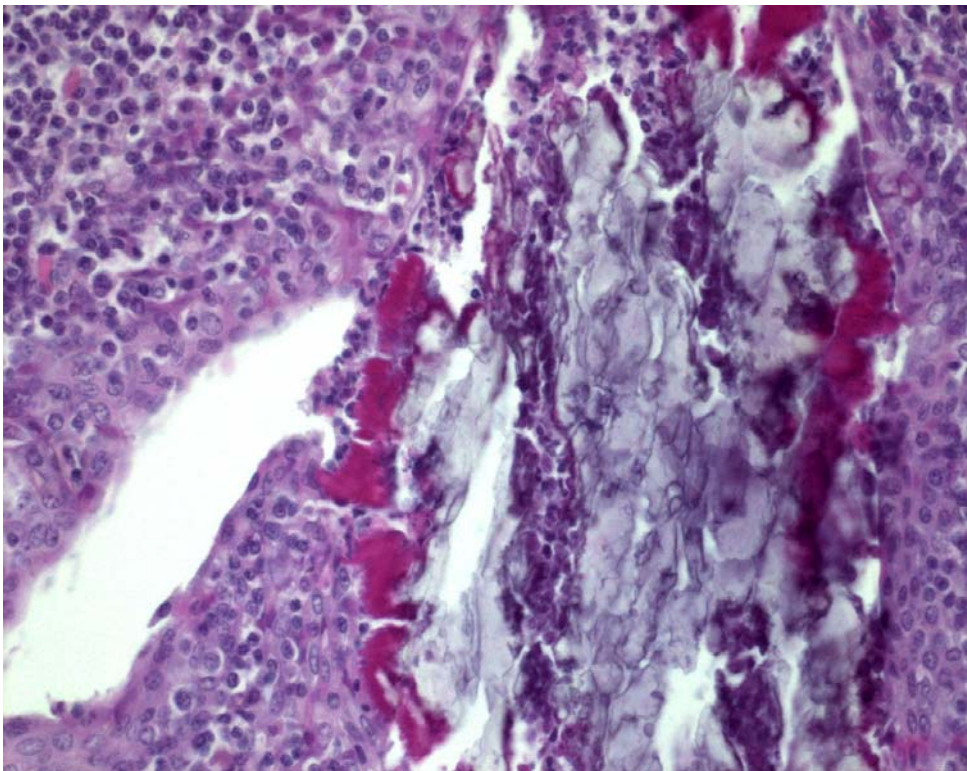


Figura 8. Tonsilla, aggregati di cellule infiammatorie disposte intorno ad aree PAS + in corso di tonsillite granulomatosa da corpo estraneo di origine vegetale; PAS, ob. 25x.

Indagini di immunofluorescenza

Studi preliminari eseguiti su diversi tessuti hanno consentito di evidenziare una elevata positività nel tessuto linfoide pertanto le indagini per svelare la presenza del virus mediante immunofluorescenza sono state concentrate su queste sezioni.

Le osservazioni sono state pertanto eseguite su 52 campioni per la provincia di Grosseto e su 84 linfonodi per la provincia di Pisa.

Grosseto

Dei 52 campioni, 22 (42,3 %) sono risultati positivi all'antigene virale di PCV-2. (tabella 9). Il 43,7% dei soggetti inferiore ad un anno d'età è risultato positivo, negli esemplari superiori ad un anno la percentuale è del 41,6%. La percentuale delle femmine positive si stabilisce intorno al 38%(11/29), sale al 47% (11/23) quella dei maschi positivi. Tuttavia, interpretando i dati con una regressione Logit, per variabili binarie, e con un test X^2 (*chi-quadrato*) si ottiene che le differenze delle positività tra i sessi non sono significative, così come non sono significative le percentuali delle positività in base all'età degli animali.

| | Positivi + | Negativi - |
|--------------------|------------|------------|
| Linfonodi (n = 52) | 22 (42,3%) | 30 (57,7%) |
| ≤ 1 anno (n = 16) | 7 (43,7%) | 9 (56,3%) |
| > 1 anno (n = 36) | 15 (41,6%) | 21 (58,3%) |
| Femmine (n = 29) | 11 (37,9%) | 18 (62,1%) |
| Maschi (n = 23) | 11 (47,8%) | 12 (52,2%) |

Tabella 9. Risultati relativi alle indagini di immunofluorescenza, provincia di Grosseto

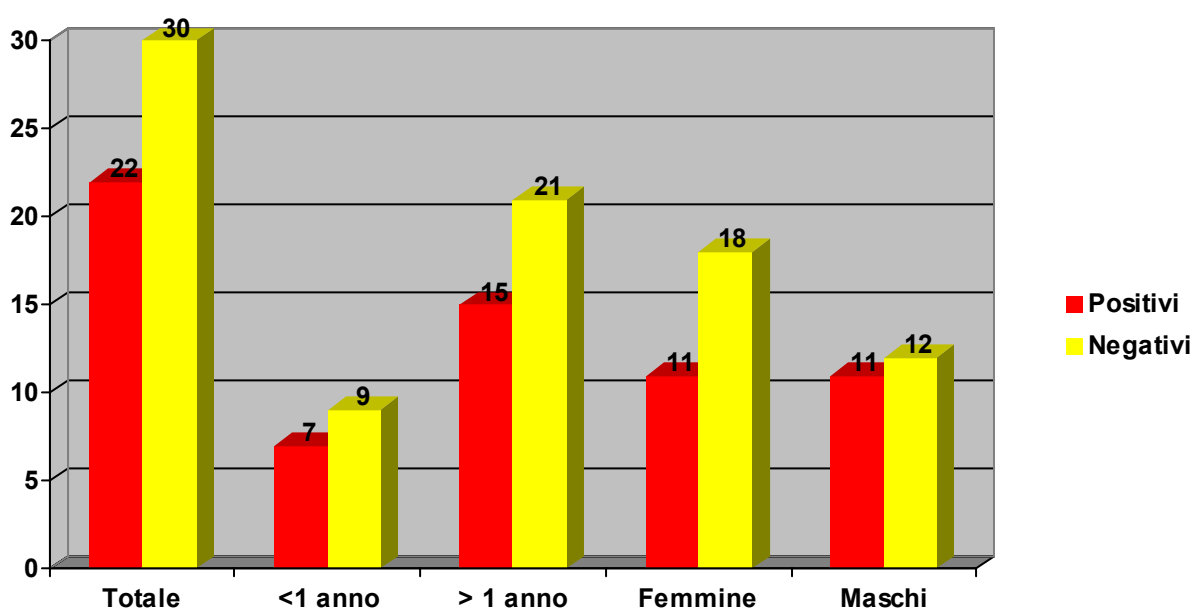


Grafico 1. Istogramma a barre. Indagini di immunofluorescenza, provincia di Grosseto

Pisa

Dei nostri campioni, 11(13,1%) sono risultati positivi all'antigene virale di PCV-2 (tabella 10). Tra i positivi, 2 provenivano da animali di età inferiore ad un anno e 9 da animali superiori ad un anno di età riferendo così percentuali molto vicine (10 % e 14%). La positività nelle femmine è stata fissata al 18% (6/33), nei maschi il valore si abbassa fino al 10%. Allo stesso modo i dati sono stati interpretati con una regressione Logit, e con un test X^2 . Anche in questo caso non vengono considerate significative le divergenze tra le percentuali.

| | Positivi + | Negativi - |
|--------------------|------------|------------|
| Linfonodi (n = 84) | 11 (13,1%) | 73 (86,9%) |
| ≤ 1 anno (n = 20) | 2 (10 %) | 18 (90 %) |
| > 1 anno (n = 64) | 9 (14,1%) | 55 (85,9%) |
| Femmine (n = 33) | 6 (18,2%) | 27 (81,8%) |
| Maschi (n = 51) | 5 (9,8%) | 46 (90,2%) |

Tabella 10. Risultati relativi alle indagini di immunofluorescenza, provincia di Pisa

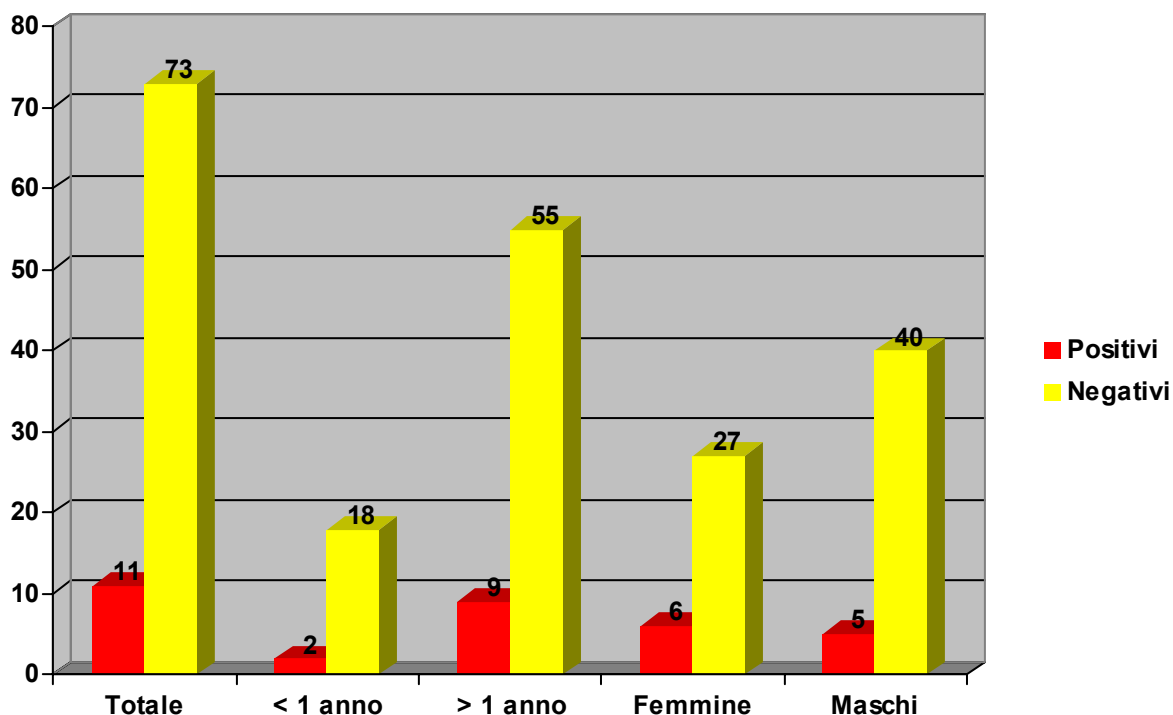


Grafico 2. Istogramma a barre. Indagini di immunofluorescenza provincia di Pisa.

Non è stato possibile apprezzare la presenza dell'antigene virale in altri tessuti, sono risultati quindi negativi testicolo, ghiandole bulbo-uretrali, prostata ed utero. Queste sedi non sono considerate infatti tipiche per la localizzazione del virus che si concentra maggiormente, come già detto, negli organi linfatici.

Abbiamo valutato come positivi quei campioni dove si poteva riscontrare una attivazione della risposta immunitaria; in particolare la presenza di antigene virale nel citoplasma delle cellule fagocitarie è stata considerata come discriminante (Figura 9, figura 11).

Si è potuto osservare una particolare localizzazione dei macrofagi positivi per l'antigene virale, concentrati soprattutto a livello periferico rispetto ai follicoli linfatici, senza invadere il centro germinativo (Figura 10). La disposizione periferica era direttamente proporzionale alla positività del campione, cioè ad una maggior positività si osservava una più evidente concentrazione perifollicolare.

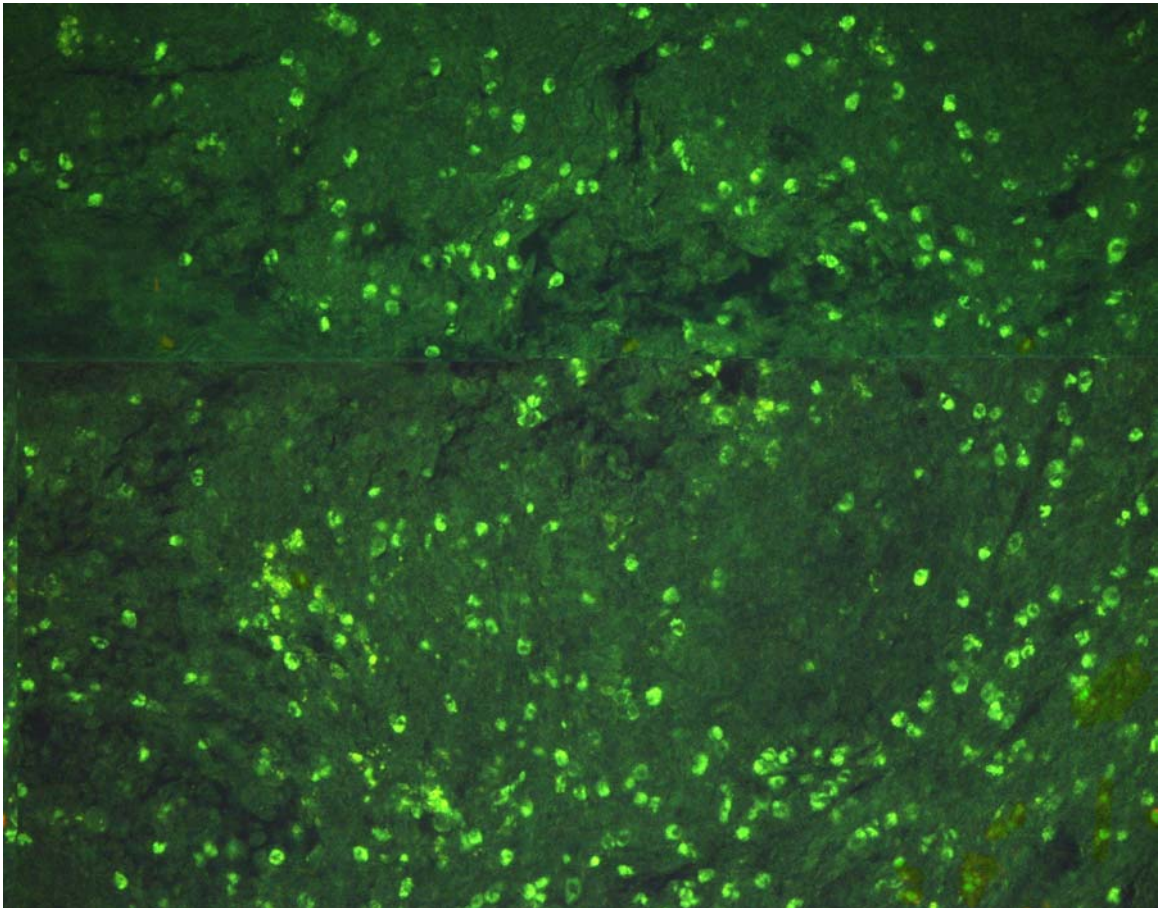


Figura 9. Linfonodo, positività citoplasmatica per PCV-2 di cellule fagocitarie; Immunofluorescenza, ob.25x.

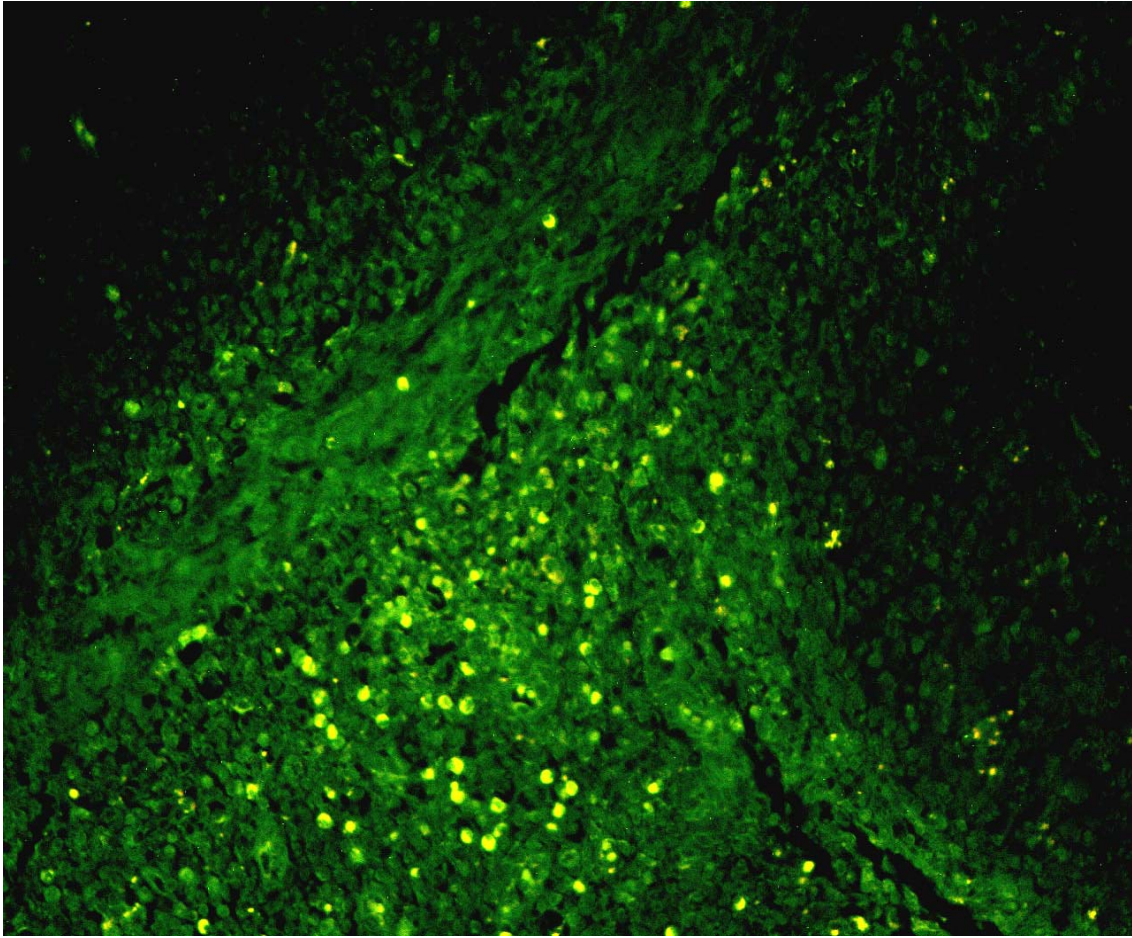


Figura 10. Linfonodo, disposizione perifollicolare delle cellule fagocitarie positive per PCV-2; Immunofluorescenza, ob.25x.

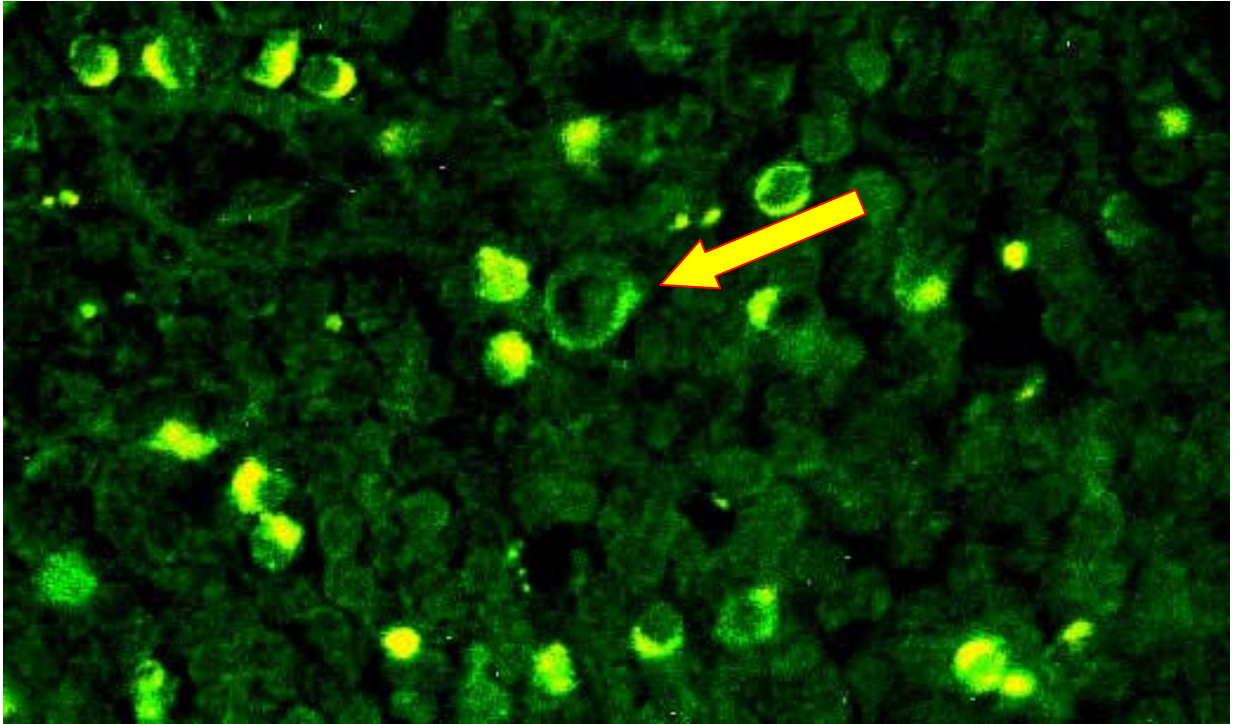


Figura 11. Linfonodo, positività citoplasmatica per PCV-2 di un macrofago; Immunofluorescenza, ob.100x.

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

Le indagini di immunofluorescenza condotte sul tessuto linfonodale hanno permesso di dimostrare contemporaneamente la presenza e la prevalenza di PCV-2 nelle popolazioni di cinghiale delle province esaminate. Così com'è già stato dimostrato per il suino, i risultati confermano l'ipotesi di una presenza endemica del virus in questa specie.

Le due aree hanno rivelato delle discrepanze piuttosto evidenti nel numero di casi positivi per la ricerca dell'antigene virale: a Grosseto il 42% dei soggetti si è dimostrato infetto, a Pisa il 13%. Da un'analisi dei dati relativi agli abbattimenti di cinghiale nelle due zone, risulta che nella provincia di Grosseto è presente una densità di capi notevolmente maggiore, e quindi compatibile con la più elevata circolazione del virus (Allegato V). Si ipotizza che proprio questa differenza nel numero di individui sia alla base dell'alta percentuale di positività ottenuta per tale provincia.

Nonostante i campioni siano stati suddivisi in base al sesso ed in base all'età, l'interpretazione statistica tramite il test χ^2 , non ha messo in evidenza alcuna differenza significativa.

In aggiunta, essendo stati selezionati per lo studio soggetti abbattuti regolarmente durante le stagioni venatorie e non animali scelti in base alla sintomatologia clinica, i risultati ottenuti non devono sorprendere; va comunque segnalato come tali risultati restino in linea con i precedenti studi condotti nel resto d'Europa (positività tra il 10 e il 50%) (*Vicente et al., 2004*).

Le indagini preliminari di immunofluorescenza hanno portato ad escludere positività in organi come rene, polmone, fegato e milza concentrandosi unicamente nel tessuto linfoide. In questo tessuto si è potuto osservare una particolare collocazione delle cellule fagocitarie positive per PCV-2, disposte a livello perifollicolare. La localizzazione esclusiva nel tessuto linfoide e la concentrazione delle cellule fagocitarie a livello perifollicolare che si è riscontrata nei tessuti positivi esprime comunque un limitato coinvolgimento dell'ospite.

Nonostante le percentuali di reperti in cui si è potuta confermare la presenza di PCV-2, le lesioni caratteristiche attribuibili all'azione patogena del virus si sono osservate in un numero ridotto di casi. Le

alterazioni macroscopiche e microscopiche riscontrate si possono attribuire in gran parte ad infezioni di tipo secondario. Sono mancate quindi nei nostri campioni, quelle lesioni caratteristiche di PCV-2 che nel suino si ritrovano usualmente a carico di molti tessuti. In particolar modo a carico del tessuto polmonare si sono repertate lesioni di varia natura e grado come polmoniti parassitarie da *Metastrongylus sp.* o ancora polmoniti eosinofiliche, mentre scarso è stato il numero di polmoniti a cellule giganti, associate solitamente all'infezione da Circovirus.

Allo stesso modo, gli altri tessuti esaminati (quello splenico, tonsillare e renale) non hanno mostrato le lesioni tipiche del virus, come, ad esempio, un infiltrato linfo-istocitario e la presenza di cellule giganti.

Il limitato coinvolgimento dell'ospite, la localizzazione perifollicolare, l'assenza di lesioni caratteristiche ed i bassi valori di positività suggeriscono per il cinghiale un ruolo di serbatoio del virus.

Queste affermazioni richiedono indubbiamente future indagini di conferma, in modo da stabilire con più precisione la responsabilità dell'animale nell'epidemiologia della virosi. Va sottolineato come in bibliografia si sia riscontrata una notevole carenza di informazioni relative agli animali inferiori all'anno d'età, proprio perché questi

ultimi rivestono in ambito venatorio un interesse sicuramente inferiore. E' auspicabile quindi uno studio sulla mortalità dei suinetti in modo da poter stabilire il reale danno che PCV-2 infligge alle popolazioni selvatiche: l'utilizzo di radio collari da applicare ai piccoli potrebbe concorrere alla raccolta di osservazioni altrimenti affidate solamente ad un ritrovamento casuale (*Vicente et al. 2004*).

Questo lavoro, ponendosi all'interno di uno studio sullo stato sanitario della fauna selvatica in Toscana, vuole rappresentare uno strumento per valutare la situazione dell'infezione in tutta la regione e potrà essere impiegato come interessante indagine retrospettiva nelle future ricerche sull'andamento della prevalenza di PCV-2.

In conclusione si può affermare che determinare la presenza e la prevalenza del virus nelle zone considerate, potrebbe consentire l'elaborazione di misure preventive e piani di eradicazione per minimizzare il contagio tra il cinghiale e il suino, soprattutto alla luce dell'intensificarsi delle pratiche d'allevamento estensivo e dell'importanza economico-sociale che quest'ultimo riveste nella realtà zootecnica toscana.

ALLEGATI

PISA

Allegato I. Località di abbattimento, ATC, età e sesso dei cinghiali esaminati

| Campione N° | Zona abbattimento | ATC | Età | Sesso |
|-------------|-------------------|-----|-----|-------|
| 1 | Crespina | 14 | ≤1 | M |
| 2 | Crespina | 14 | >1 | M |
| 3 | Castellina M. ma | 14 | >1 | M |
| 4 | Castellina M. ma | 14 | ≤1 | F |
| 5 | Castellina M. ma | 14 | ≤1 | F |
| 6 | Chianni | 14 | >1 | M |
| 7 | Fauglia | 14 | >1 | M |
| 8 | Fauglia | 14 | ≤1 | M |
| 9 | Fauglia | 14 | >1 | M |
| 10 | Fauglia | 14 | >1 | M |
| 11 | Lajatico | 14 | ≤1 | F |
| 12 | Lajatico | 14 | >1 | M |
| 13 | Lajatico | 14 | >1 | M |
| 14 | Lajatico | 14 | ≤1 | M |
| 15 | Lari | 14 | >1 | F |
| 16 | Lari | 14 | >1 | M |
| 17 | Lari | 14 | >1 | M |
| 18 | Lari | 14 | >1 | F |
| 19 | Lari | 14 | >1 | M |
| 20 | Montecatini | 14 | ≤1 | M |
| 21 | Montecatini | 14 | >1 | F |
| 22 | Montecatini | 14 | >1 | F |
| 23 | Montecatini | 14 | >1 | F |
| 24 | Montecatini | 14 | ≤1 | M |
| 25 | Montecatini | 14 | ≤1 | M |
| 26 | Montecatini | 14 | >1 | M |
| 27 | Montecatini | 14 | >1 | M |
| 28 | Montecatini | 14 | ≤1 | M |

| Campione N° | Zona abbattimento | ATC | Età | Sesso |
|------------------------|------------------------------|------------|------------|--------------|
| 29 | Montecatini | 14 | >1 | F |
| 30 | Montecatini | 14 | >1 | F |
| 31 | Montecatini | 14 | >1 | M |
| 32 | Montecatini | 14 | >1 | M |
| 33 | Montecatini | 14 | >1 | M |
| 34 | Montecatini | 14 | ≤1 | F |
| 35 | Montecatini | 14 | >1 | M |
| 36 | Monti Pisani | 14 | ≤1 | M |
| 37 | Monti Pisani | 14 | >1 | M |
| 38 | Monti Pisani | 14 | >1 | F |
| 39 | Monti Pisani | 14 | >1 | M |
| 40 | Monti Pisani | 14 | >1 | M |
| 41 | Monti Pisani | 14 | >1 | F |
| 42 | Monti Pisani | 14 | ≤1 | F |
| 43 | Monti Pisani | 14 | >1 | F |
| 44 | Monti Pisani | 14 | ≤1 | F |
| 45 | Monti Pisani | 14 | >1 | M |
| 46 | Monti Pisani | 14 | ≤1 | M |
| 47 | Monti Pisani | 14 | >1 | F |
| 48 | Monti Pisani | 14 | >1 | F |
| 49 | Monti Pisani | 14 | >1 | M |
| 50 | Monti Pisani | 14 | >1 | M |
| 51 | Monti Pisani | 14 | >1 | F |
| 52 | Monti Pisani | 14 | >1 | F |
| 53 | Monti Pisani | 14 | ≤1 | F |
| 54 | Monti Pisani | 14 | >1 | M |
| 55 | Monti Pisani | 14 | ≤1 | F |
| 56 | Montescudaio | 14 | >1 | F |
| 57 | Montescudaio | 14 | ≤1 | M |
| 58 | Montescudaio | 14 | >1 | F |
| 59 | Montescudaio | 14 | >1 | F |
| 60 | Monteverdi | 14 | >1 | M |
| 61 | Monteverdi | 14 | ≤1 | M |
| 62 | Monteverdi | 14 | >1 | M |
| 63 | Monteverdi | 14 | ≤1 | F |
| 64 | Monteverdi | 14 | >1 | F |
| 65 | Monteverdi | 14 | >1 | F |
| 66 | Monteverdi | 14 | >1 | M |
| 67 | Monteverdi | 14 | >1 | M |
| 68 | Monteverdi | 14 | ≤1 | M |
| 69 | Monteverdi | 14 | >1 | F |
| 70 | Monteverdi | 14 | >1 | F |
| 71 | Monteverdi | 14 | ≤1 | M |
| 72 | Monteverdi | 14 | >1 | M |
| 73 | Riparbella | 14 | ≤1 | M |

| Campione N° | Zona abbattimento | ATC | Età | Sesso |
|------------------------|------------------------------|------------|------------|--------------|
| 74 | Riparbella | 14 | >1 | M |
| 75 | Riparbella | 14 | >1 | F |
| 76 | Riparbella | 14 | >1 | M |
| 77 | Riparbella | 14 | ≤1 | M |
| 78 | Riparbella | 14 | >1 | M |
| 79 | Riparbella | 14 | ≤1 | M |
| 80 | Riparbella | 14 | >1 | M |
| 81 | Riparbella | 14 | >1 | M |
| 82 | Riparbella | 14 | 1 | F |
| 83 | Santa Luce | 14 | >1 | M |
| 84 | Santa Luce | 14 | >1 | F |
| 85 | Santa Luce | 14 | >1 | M |
| 86 | Santa Luce | 14 | >1 | M |
| 87 | Santa Luce | 14 | >1 | M |
| 88 | Santa Luce | 14 | ≤1 | M |
| 89 | San Miniato | 14 | >1 | M |
| 90 | San Miniato | 14 | >1 | M |
| 91 | San Miniato | 14 | >1 | F |
| 92 | San Miniato | 14 | >1 | M |

Allegato II. Organi prelevati dai 92 cinghiali esaminati.

| N° | POLMONE | LINFONODO | TONSILLA | UTERO | TESTICOLO | PROSTATA | GHIANDOLE BULBOURETR. |
|----|---------|-----------|----------|-------|-----------|----------|-----------------------|
| 1 | √ | | √ | | √ | √ | |
| 2 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 3 | √ | √ | | | | | √ |
| 4 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 5 | √ | | √ | √ | | | |
| 6 | | | | | √ | | |
| 7 | √ | √ | √ | | √ | √ | √ |
| 8 | √ | √ | √ | | √ | | |
| 9 | √ | | | | √ | √ | |
| 10 | √ | | √ | | √ | √ | |
| 11 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 12 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 13 | √ | | | | √ | √ | |
| 14 | √ | √ | | | | | √ |
| 15 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 16 | √ | √ | | | √ | √ | √ |
| 17 | √ | √ | | | √ | √ | √ |
| 18 | √ | √ | | √ | | | |
| 19 | | √ | | | √ | √ | |
| 20 | √ | √ | | | √ | √ | √ |
| 21 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 22 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 23 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 24 | √ | √ | √ | | | √ | √ |
| 25 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 26 | √ | √ | √ | | √ | | |
| 27 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 28 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 29 | | √ | √ | | | | |
| 30 | | √ | √ | √ | | | |
| 31 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 32 | | √ | √ | | √ | √ | √ |
| 33 | | √ | √ | | √ | | |
| 34 | | √ | √ | | √ | | |
| 35 | √ | √ | √ | | √ | | |
| 36 | √ | √ | √ | | | | |
| 37 | √ | √ | √ | | √ | | |
| 38 | | √ | √ | √ | | | |
| 39 | √ | √ | √ | | | | |
| 40 | √ | √ | √ | | | | |
| 41 | | √ | √ | √ | | | |

| N° | POLMONE | LINFONODO | TONSILLA | UTERO | TESTICOLO | PROSTATA | GHIANDOLE BULBOURETR. |
|----|---------|-----------|----------|-------|-----------|----------|--------------------------|
| 42 | | √ | √ | | | | |
| 43 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 44 | | √ | √ | √ | | | |
| 45 | √ | √ | √ | | | | |
| 46 | √ | √ | √ | | √ | | |
| 47 | √ | √ | √ | | | | |
| 48 | | √ | √ | √ | | | |
| 49 | | √ | √ | | √ | √ | |
| 50 | | | √ | | √ | √ | |
| 51 | | √ | √ | | | | |
| 52 | | √ | √ | √ | | | |
| 53 | | √ | √ | √ | | | |
| 54 | √ | √ | √ | | √ | √ | √ |
| 55 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 56 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 57 | √ | √ | √ | | √ | √ | √ |
| 58 | | √ | √ | √ | | | |
| 59 | √ | √ | √ | | | | |
| 60 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 61 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 62 | √ | √ | √ | | | | |
| 63 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 64 | | √ | √ | √ | | | |
| 65 | | √ | √ | | | | |
| 66 | | √ | √ | | | | |
| 67 | | √ | √ | | | | |
| 68 | √ | | | | √ | √ | |
| 69 | √ | √ | | √ | | | |
| 70 | √ | √ | | √ | | | |
| 71 | √ | √ | | | √ | √ | |
| 72 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 73 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 74 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 75 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 76 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 77 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 78 | √ | √ | √ | | √ | | |
| 79 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 80 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 81 | √ | √ | √ | | | | |
| 82 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 83 | √ | √ | √ | | | | |
| 84 | √ | √ | √ | | | | |
| 85 | √ | √ | √ | | | √ | |

| N° | POLMONE | LINFONODO | TONSILLA | UTERO | TESTICOLO | PROSTATA | GHIANDOLE BULBOURETR. |
|----|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|---|
| 86 | √ | √ | √ | | | | |
| 87 | √ | √ | | | √ | | |
| 88 | √ | √ | | | | | √ |
| 89 | √ | √ | √ | | | √ | |
| 90 | √ | √ | √ | | | √ | |
| 91 | √ | √ | √ | | | | |
| 92 | √ | √ | √ | | | | √ |
| | Polmoni 70 | Linfonodi 84 | Tonsille 76 | Utero 25 | Testicoli 24 | Prostata 35 | Ghiandole Bulbouretr. 12 |

GROSSETO

Allegato III. Località di abbattimento, ATC, età e sesso dei cinghiali esaminati

| Campione N° | Zona abbattimento | ATC | Età | Sesso |
|----------------|----------------------|-----|-----|-------|
| 1 | Roselle | 7 | ≤1 | M |
| 2 | Roselle | 7 | >1 | F |
| 3 | Roselle | 7 | ≤1 | F |
| 4 | Roselle | 7 | ≤1 | F |
| 5 | Roselle | 7 | ≤1 | F |
| 6 | Roselle | 7 | >1 | F |
| 7 | Roselle | 7 | ≤1 | F |
| 8 | Roselle | 7 | >1 | M |
| 9 | Roselle | 7 | >1 | M |
| 10 | Roselle | 7 | ≤1 | F |
| 11 | Roselle | 7 | >1 | M |
| 12 | Vallerotana | 7 | >1 | M |
| 13 | Vallerotana | 7 | >1 | M |
| 14 | Vallerotana | 7 | ≤1 | F |
| 15 | Vallerotana | 7 | >1 | F |
| 16 | Vallerotana | 7 | >1 | F |
| 17 | Vallerotana | 7 | >1 | F |
| 18 | Vallerotana | 7 | >1 | M |
| 19 | Vallerotana | 7 | >1 | M |
| 20 | Vallerotana | 7 | ≤1 | M |
| 21 | Vallerotana | 7 | >1 | M |
| 22 | Vallerotana | 7 | >1 | M |
| 23 | Vallerotana | 7 | >1 | M |
| 24 | Vallerotana | 7 | >1 | F |
| 25 | Vallerotana | 7 | >1 | F |
| 26 | Vallerotana | 7 | >1 | F |
| 27 | Vallerotana | 7 | >1 | F |
| 28 | Caprarecce | 7 | ≤1 | F |
| 29 | Caprarecce | 7 | >1 | F |
| 30 | Caprarecce | 7 | >1 | M |
| 31 | Caprarecce | 7 | >1 | M |
| 32 | Caprarecce | 7 | >1 | F |
| 33 | Caprarecce | 7 | >1 | F |
| 34 | Caprarecce | 7 | >1 | F |
| 35 | Caprarecce | 7 | >1 | F |

| Campione N° | Zona abbattimento | ATC | Età | Sesso |
|------------------------|------------------------------|------------|------------|--------------|
| 36 | Caprarecce | 7 | >1 | M |
| 37 | Caprarecce | 7 | ≤1 | F |
| 38 | Caprarecce | 7 | >1 | F |
| 39 | Caprarecce | 7 | ≤1 | M |
| 40 | Caprarecce | 7 | ≤1 | F |
| 41 | Caprarecce | 7 | >1 | M |
| 42 | Baccinello | 7 | >1 | M |
| 43 | Baccinello | 7 | >1 | F |
| 44 | Baccinello | 7 | >1 | M |
| 45 | Baccinello | 7 | >1 | F |
| 46 | Buriano | 7 | ≤1 | M |
| 47 | Buriano | 7 | ≤1 | F |
| 48 | Buriano | 7 | >1 | F |
| 49 | Buriano | 7 | ≤1 | M |
| 50 | Buriano | 7 | >1 | F |
| 51 | Buriano | 7 | >1 | M |
| 52 | Buriano | 7 | ≤1 | F |
| 53 | Buriano | 7 | >1 | F |
| 54 | Buriano | 7 | ≤1 | M |
| 55 | Buriano | 7 | >1 | F |

Allegato IV. Organi prelevati dai 54 cinghiali esaminati.

| N° | RENE | FEGATO | POLMONE | MILZA | LINFONODO | TONSILLA | TESTICOLO |
|----|------|--------|---------|-------|-----------|----------|-----------|
| 1 | | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| 2 | √ | | | | √ | √ | |
| 3 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 4 | √ | | | | √ | √ | |
| 5 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 6 | | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 7 | | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 8 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 9 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 10 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 11 | | √ | √ | | √ | √ | |
| 12 | | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 13 | √ | | √ | | √ | √ | |
| 14 | √ | √ | | | √ | √ | |
| 15 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 16 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 17 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 18 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 19 | | | √ | | √ | √ | |
| 20 | | √ | √ | | √ | √ | |
| 21 | | √ | | | √ | √ | |
| 22 | √ | √ | | √ | √ | √ | √ |
| 23 | √ | √ | √ | √ | √ | | |
| 24 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 25 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 26 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 27 | √ | √ | √ | | | √ | |
| 28 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 29 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 30 | √ | √ | | √ | √ | √ | √ |
| 31 | | √ | √ | | √ | √ | |
| 32 | √ | √ | √ | √ | √ | | |
| 33 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 34 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 35 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 36 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 37 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 38 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 39 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 40 | √ | √ | √ | √ | | | |
| 41 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| 42 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |

| N° | RENE | FEGATO | POLMONE | MILZA | LINFONODO | TONSILLA | TESTICOLO |
|----|--------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 43 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 44 | √ | √ | √ | √ | | √ | |
| 45 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 46 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| 47 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 48 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| 49 | √ | √ | | √ | √ | √ | |
| 50 | √ | √ | √ | | √ | √ | √ |
| 51 | √ | √ | √ | | √ | √ | |
| 52 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 53 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| 54 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | |
| | Rene 46 | Fegato 51 | Polmone 48 | Milza 41 | Linfonodo 52 | Tonsille 52 | Testicolo 7 |

Allegato V. Dati relativi agli abbattimenti di cinghiale.

| | Anno | Capi abbattuti | Densità abbattimenti x 100 ha |
|-----------|-----------|-------------------|-------------------------------------|
| GROSSETO | | | |
| A.T.C. 7 | 2002/2003 | 3420 | 4,3 |
| A.T.C. 8 | 2002/2003 | 2385 | 4,0 |
| PISA | | | |
| A.T.C. 14 | 2005/2006 | 1520 | 5,3 |
| A.T.C. 15 | 2005/2006 | 989 | 5,7 |

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Albinia E. , Cabriolet R. , Eveno E et al.

Premiers résultats du CNEVA sur le dépérissement fetal du porcelet en fin de post-sevrage.

Suppl Sem Vet 1996 ; 834 : 1-2.

Albinia E. , Mespedale A. , Chenut G. et al.

A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in French wild boar from 1991 to 1998.

Vet Microbiol 2000; 77: 43-57.

Allan G.M. , Kennedy S. , McNeilly F. et al.

Experimental reproduction of wasting disease and death by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus.

J of Comp Pathol 1999; 121: 1-11.

Allan G.M. , Mackie D.P. , McNair J et al.

Production preliminary characterization and application of monoclonal antibodies to porcine circovirus.

Vet Immunol Immunopathol 1994; 43: 357-371.

Allan G.M. , Mcneilly F. , Cassidy J.P. et al.

Pahogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrums deprived piglets and examination of pig foetal material.

Vet Microbiol 1995; 44: 49-64

Allan G.M. , McNeilly F. , Foster J.C. et al.

Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus.

Vet Microbiol 1994; 41: 267-279.

Allan G.M. , McNeilly F. , Kennedy S. et al.

Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the United States of America and Europe.

J Vet Diagn Invest 1998; 10: 3-10.

Allan G.M. , McNeilly F. , Meehan B.M. et al.

Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland.

Vet Microbiol 1999; 66: 115-123.

Allan G.M. , Meehan B.M. , Todd D. et al.

Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes.

Vet Rec 1998; 142: 467-468.

Allan G.M. , Phenix K.V. , Todd D. et al.

Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus.

J Vet Med B 1994; 41: 17-26

Balash M. , Segalès J. , Rosell C. et al.

Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome.

J Comp Pathol 1999; 121: 139-148.

Buhk H.J. , Tisher I. , Koch M.A.

Cloning and sequencing of porcine circovirus (PCV) genome.

Zentralbe Bakteriolog Org A 1985; 260: 465.

Choi C. , Chae C.

In-situ hybridization for the detection of porcine circoviruses with post-weaning multisystemic wasting syndrome.

J Comp Pathol 2000

Churg J. , Sobin L.H.

Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Diseases

IGAKU-SHOIN Ltd. Tokio-New York 1982.

Clark E.G.

Pathology of the post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs.
Proc West Can Assoc Swine Pract 1996; 22-25.

Cotrell T.S. , Frienship R.M. , Dewey C.E. et al.

Epidemiology of post-weaning multisystemic wasting syndrome in Ontario.

Proc Am Assoc Swine Pract 1999; 389-390.

Couser WG.

Pathogenesis of glomerulonephritis

Kidney Int 1993; 44, Suppl. 42: S19-S26.

Csagola A., Kecskemeti S., Kardos G. et al.

Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungary wild boars.

Vet Rec. 2004

Daft B. , Nordhausen R.W. , Latimer K.S. et al.

Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six week-old pig.

Proc Am Assoc of Vet Lab Diagn 1996; 39: 32

Drolet R. , Thibault S. , D'Allaire S. , Thompson JR.

Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS): an overview of the disease.

Sw Hlth & Prod 1999; 6: 283-285.

Dulac G.C. , Afshar A.

Porcine circovirus antigens in PK/15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can J Vet Res* 1989; 53: 431-433.

Edwards S. , Sands J. J.

Evidence of circovirus infection in British pigs.

Vet Rec 1994; 134: 680-681.

Ellis J. , Bratanich A. , Clark E.G. et al.

Co-infection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired post-weaning multisystemic wasting syndrome.

J Vet Diagn Invest 12 2000.

Ellis J. , Hassard L. , Clark E.G. et al.

Isolation of circovirus from lesions of pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome.

Can Vet J 1998; 39: 44-51.

Ellis J. , Krakowka S. , Allan G. et al. The clinical scope of PRRSV infection has expanded since 1987; an alternative explanation.

Vet Pathol 1999; 36: 262-265.

Ellis J. , Krakowka S. , Lairmore M. et al.

Reproduction of lesions of post-weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets.

J Vet Diagn Invest 1999; 11: 3-14.

Gibbs M.J. , Weiller F. W.

Evidence plant a virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus.

Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 8022-8027.

Gresham A. , Jackson G. , Giles N.

PMWS and porcine nephropathy syndrome in Great Britain.

Vet Rec 2000; 146: 143.

Hamel A.L. , Lin L.L. , Nayar G.P.S.

Nucleotide sequence of porcine circoviruses associated with post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs.

J Virol 1998; 72: 5262-5267.

Harding J.C.

Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation.

Proc West Can Assoc Swine Pract 1996; 21.

Hardings J.C. , Clark E.G. , Strokappe J.H. et al.

Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): epidemiology and clinical presentation.

Swine Health Prod 1998; 6: 249-254.

Helie P. , Drolet R. , Germain M.C.

Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec.

Can Vet J 1995; 36: 150-154.

Hines R.K. , Lukert P.D.

Porcine circovirus as a cause of congenital tremors in newborn pigs.

Proc Am Assoc Swine Pract 1994; 344-345.

Hinrichs U. , Ohlinger V.F. , Pesh S. et al.

First report of porcine circovirus type-2 infection in Germany.

Tieraerztl Umsch 1999; 54: 255-258.

Horner G.

Pig circovirus antibodies present in New Zealand pigs.

Surveil Wellington 1991; 18: 23.

Kennedy S. , Allan G.M. , McNeilly F. et al.

Porcine circovirus infection in Northern Ireland .

Vet Rec 1998; 142: 495-496.

Kuipel M. , Stevenson G.W. , Mittal S.K. , Clark E.G.

Circovirus-like disease in weaned pigs in Indiana.

Vet Pathol 1998; 35: 303-307.

Krakowa S. , Ellis J.A. , McNeilly F. et al.

Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2).

Vet Pat 2001; 38: 31-42.

Laddomada A.

Incidence and control of CSF in wild boar in Europe.

Vet Microbiol 2000 ; 73 :121-130.

Larochelle R. , Morin M . , Antaya M. et al.

Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR.

Vet Rec 1999; 145: 140-142.

LeCann P. , Albina E. , Madec F.

Piglet wasting disease.

Vet Rec 1997; 141: 660.

Lukert P. , de Boer G.F. , Dale J.L. et al.

The Circoviridae . In : Virus taxonomy. Sixth report of international Committee on Taxonomy of Viruses.

Ed Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL et al. pp. 166-168. Springer-Verlag, Vienna and New-York.

Machuca M. , Sealés J. , Idiart J.R.

Sindrome de dermatitis y nefropatia porcina en la Republica Argentina: patologia y deteccion de circovirus porcino

9° Enc Nac de Pat Vet (ENAPAVE) 1999.

Mankertz A. , Blaess G. , Mankertz J. et al.

Analysis of transcription and replication of porcine circovirus PCV.

IXth Int Congr Virol 1993; 1939: 76 [Abstract]

Mankertz A. , Mankertz J. , Wolf K. et al.

Identification of a protein essential fo replication of porcine circovirus.

J Gen Virol 1998; 79: 381-384.

Mankertz A. , Persson F. , Mankertz J. et al.

Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus.

J Virol 1997; 71: 2562-2566.

Mari M. , Ragionieri G. , Perfetti M.G.

Indagine preliminare di una epidemia di Circovirus suini (PCV2) in un allevamento di cinghiali della provincia di Siena.

Dati non pubblicati

McNeilly F. , Allan G.M. , Foster J.C. et al.

Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function.

Vet Immunol Immunopathol 1996; 49: 295-306.

McNeilly F. , Kennedy S. , Moffett D. et al.

A comparison of *in-situ* hybridization and immunocytochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pig with post-weaning multisystemic wasting syndrome.

J Virol Methods 1999; 80: 123-128.

Meehan B.M. , Creelan J.L. , McNulty M.S. , Todd D. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses.

J Gen Virol 1997; 78: 221-227.

Meehan B.M. , McNeilly F.

Todd D. et al. Characterization of novel circoviruses associated with wasting syndromes in pigs.

Gen Virol 1998; 79: 2171-2179.

Morozov I. , Sirinaurumiter T. , Sorden S.D. et al. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome.

J Clin Microbiol 1998; 36: 2535-2541.

Nayar G.P.S. , Hamel A. , Lin L.

Detection and characterization of porcine circovirus associated with post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs.

Can Vet J 1997; 38: 385-386.

Niagro F.D. , Forsthoefel A.N. , Lawthr R.P. et al.

Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes; intermediates between the geminivirus and plant circovirus.

Arch Virol 1998; 143: 1723-1744.

Pallares F, Halbur P.G., Opriessnig T. et al.

Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).

J. Vet Diagnostic Investigation 2002; 14: 515-519.

Poli A. , Guarda F. , Mazzei M. et al.

Osservazioni preliminari sulla prevalenza ed il tipo di glomerulonefriti nel suino.

XXVIII Meeting annuale Soc. It. Pat. All. Suino 2002;

Ramos-Vara J.A. , Duran O. , Render J.A.

Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA.

Vet Rec 1997; 141: 479-480.

Rodrigue-Arroja G.M. , Segalès J. , Rossel C. et al.

Aujeszky's disease virus infection concurrent with post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs.

Vet Rec 1999; 144: 152-153.

Rossel C. , Segalès J. , Plana-Duran J. et al.

Pathological, immunohistochemical and *in-situ* hybridization studies of natural cases of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs.

J Comp Pathol 1999; 120: 59-78.

Sanchez R., Nauwynck H., Pensaert M.

Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig population in Belgium.

Proceedings of the European Society for Veterinary Virology 2001

Sarli G. , Panarese S. , Mandrioli L. et al.

Caratterizzazione istopatologica della nefrite in corso di PMWS del suino

V Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. 2003; 146-147.

Segalés J. , Piella J. , Marco E.

Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain.

Vet Rec 1998; 142: 483-486.

Schulze C., Segalés J., Neumann G. et al.

Identification of postweaning multisystemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus scrofa*).

Vet Rec. 2004; 154: 694-696.

Segalés J., Marco I., Calsamiglia M

Evidence of porcine circovirus type 2 infection in wild boar (*Sus scrofa*) in Spain.

Congress Ames, Iowa USA, 2002.

Segalés J. , Piella j. , Marco E. et al.

Clinicopatological findings related the first description in Spain of Porcine dermatitis/ nephropathy syndrome.

Proc of the 14th IPVS Congress 1996; 709.

Segalès J. , Sitjar M. , Domingo M. et al.

First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain.

Vet Rec 1997; 141: 600-601.

Sierra M.A. , De Las Mulas J.M.

Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis (PIGD) syndrome.

Eur J Vet Pathol 1997; 3: 63-70.

Slauson DO. , Lewis RM.

Comparative Pathology of Glomerulonephritis in Animals

Vet Pathol 1979; 16: 135-164.

Smith W.J. , Thompson J.R. , Done S.

Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs.

Vet Rec 1993; 132: 47.

Solignac T.

Syndrôme dermatite-néphropathie. Quelques observations Cliniques chez le porcelet.

Sem Vét Suppl 1997; (I-II).

Sorden S.D. , Arms P.A. , Sirunarumitir T. et al.

Porcine circovirus and PRRS virus co-infection in pigs with chronic bronchointerstitial pneumonia and lymphoid depletion: an emerging syndrome in Midwestern swine.

Proc Am Assoc Vet Lab Diagn 1998; 41: 75.

Spillane P. , Kennedy S. , Meehan B. , et al.

Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland.

Vet Rec 1998; 143: 511-512.

Thibault S. , Drolet R. , Germain M.C.

Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine.

Vet Pathol 1998; 35: 108.

Thompson J.R. , Lainson F.A.

A study of *Pasteurella Multocida* as a possible aetiological agent in porcine immune complex glomerulonephritis and dermatitis syndrome.

Proceedings of the 15th IPVS Congress 1998; 3: 396.

Tischer I. , Buhk H.J.

Viral DNA from cells infected with porcine circovirus.

Zent Baktiol Org A 1988; 270: 280-287.

Tischer I. , Gelderblom H. , Vettermann W. et al.

A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA.

Nature 1982; 295: 64-66.

Tischer I. , Geldglom H. , Vettermann W. et al.

Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine population of different breeding farms.

Arch Virol 1995; 140: 737-743.

Tischer I. , Miels W. , Wolff D. et al .

Studies on the pathogenicity of porcine circovirus.

Arch Virol 1986; 91: 271-276.

Tischer I. , Peters D. , Pociuli S.

Occurrence and role of an early antigen and evidence for transforming ability of porcine circovirus.

Arch Virol 1995; 140: 1799-1816.

Tischer I. , Peters D. , Rasch R. et al.

Replication of porcine circovirus-induction by glucosamine and cell-cycle dependence.

Arch Virol 1987; 96: 39-57.

Tischer I. , Rasch R. , Tochtermann G.

Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines.

Zentralbe Bakteriolog Org A 1974; 226: 153-167.

Todd D. , Creelan J.L. , Meehan B.M. et al.

Investigation of transfection capability of cloned tandemly-repeated chicken anemia virus DNA fragments.

Arch Virol 1996; 141: 1523-1534.

Van Haleren A. , Bakker S. , Wessels J.C.

Dermatitis/nephropathy syndrome in pigs

Tydskrift van die Suid Afrikaanse Veteriner Mediese Verenging 1995; 66(3): 108-110

Verin R., Tursi M., Guarda F. et al.

Lesioni glomerulari associate alla presenza di Circovirus tipo 2 in suini regolarmente macellati nel Nord Italia.

Atti XXX Meeting annuale SIPAS.

Vicente J., Leon-Vizcaino L., Gortaz C. et al.

Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from south-central Spain.

J.Wildl.Dis. 2002; 38: 649-652.

Vicente J., Segalés J, Hofle U. et al.

Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection in the European wild boar (*Sus Scrofa*).

Vet Res. 2004; 35:243-253.

West K.W. , Bystrom J. , Wojnarowicz C. et al.

Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus-2.

J Vet Diagn Invest 1999.

Zlotowski P. , Rozza D.B. , Pescador C.A. , et al.

Muco-cutaneous candidiasis in two pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome.

*Vet J.*2006; 171(3): 566-569.

Zupancic Z., Jukic B., Lojkic M. et al.

Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia.

J.Vet Med Ser. 2002; 49: 253-256.