



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Dottorato di Ricerca in Medicina Veterinaria

Indagine sulla pseudorabbia e sulla circoviroosi nelle popolazioni di cinghiale (*Sus scrofa*) in Toscana

Candidato: Dr. Ranieri Verin

Relatore: Prof. Alessandro Poli

2005-2007

Indice analitico

1 INTRODUZIONE

1.1 Le patologie della selvaggina	1-2
-----------------------------------	-----

2 LA MALATTIA DI AUJESZKY O PSEUDORABBIA

2.1 Eziologia	3
2.2 Classificazione	4
2.3 Epidemiologia	4-6
2.4 Patogenesi	
2.4.1 Ingresso del virus nella cellula	6-7
2.4.2 Replicazione virale	7-8
2.4.3 Diffusione diretta del virus da cellula a cellula	8
2.4.4 Interazioni virus-ospite in assenza di immunità specifica	8-12
2.4.5 Interazioni virus-ospite in presenza di immunità specifica	12-13
2.5 Sintomatologia	13-14
2.6 Lesioni Anatomiche patologiche	14-16
2.7 Diagnosi	16-17
2.8 Profilassi	
2.8.1 Azione immunogena delle glicoproteine di PRV	17-19

3 I CIRCOVIRUS

3.1 Cenni storici: la scoperta dei circovirus suini	19
3.2 Caratteristiche biologiche dei circovirus suini	20-22
3.3 Epidemiologia	22-25
3.4 Manifestazioni morbose associate a PCVs	25-36
3.5 Diagnosi	36-38

4 IL CIRCOVIRUS NEL CINGHIALE	38-40
--------------------------------------	--------------

5 MATERIALI E METODI	
5.1 Raccolta e processazione dei campioni	41-43
5.2 Indagini istopatologiche ed istochimiche	44
5.3 Indagine sierologica	44-45
5.4 Indagini di immunoistochimica per PRV	45-46
5.5 Indagini di immunofluorescenza per PCV-2	46-47
5.6 Indagini di immunoistochimica per PCV-2	47
5.7 Indagini di biologia molecolare	48-49
6 ANALISI STATISTICHE	49
7 RISULTATI	
7.1 Indagini istopatologiche condotte sui cinghiali	50-53
7.2 Indagini sierologiche per PRV	53-54
7.3 Indagini immunoistochimiche per PRV	54-56
7.4 Indagini di biologia molecolare	56-57
7.5 Indagini di immunofluorescenza e di immunoistochimica per PCV-2	57-60
8 CONCLUSIONI	61-64
9 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	65-84

1. INTRODUZIONE

1.1. Le patologie della fauna selvatica

Le patologie della fauna selvatica rappresentano un aspetto della medicina veterinaria del quale non si ha ancora una completa conoscenza. Infatti, per quanto le ricerche e gli studi in questo campo stiano aumentando a livello nazionale ed internazionale (Dahle et al 1993; Gaffuri, et al 2002), non è sempre possibile stabilire in che modo alcune malattie si manifestano nella fauna selvatica e se i selvatici svolgano un ruolo di mantenimento e di trasmissione di agenti patogeni. Ci sono sicuramente degli esempi molto evidenti del ruolo svolto dai selvatici nell'epidemiologia di alcune malattie infettive, la cui eradicazione ha richiesto interventi di controllo e profilassi, come ad esempio la rabbia silvestre in Europa. Nella maggior parte dei casi però il coinvolgimento della fauna selvatica nel mantenimento di una infezione è solo sospettato o ipotizzato, difficilmente è correttamente dimostrato (Gaffuri et al 2002). A volte ai selvatici si attribuiscono responsabilità che, di fatto, non hanno, soprattutto quando non si riesce a dare delle spiegazioni sulla comparsa delle malattie negli animali domestici.

Lo studio delle malattie nella fauna selvatica presenta sicuramente delle difficoltà ed è spesso impossibile poter contare su un campione rappresentativo della popolazione, mancando stime attendibili della dimensione della popolazione oggetto di studio e della sua struttura demografica per classi di età. Per le specie sottoposte a prelievo venatorio si può fare riferimento ai dati dei censimenti, ma anche in questi casi la precisione delle informazioni dipende dalle tecniche di censimento utilizzate e dall'habitat della specie. Ne deriva quindi che le stime di sieroprevalenza o prevalenza di infezioni batteriche, virali e infestazioni parassitarie negli animali selvatici soffrono di distorsioni non controllabili in fase di progettazione dell'indagine (Morner, et al., 2002). Definire con chiarezza il ruolo epidemiologico dei selvatici assume, tuttavia, un'importanza prioritaria soprattutto nei

confronti di malattie della lista A dell'OIE, di quelle sottoposte a profilassi di Stato e delle zoonosi, così come per valutare la possibilità di interazioni tra domestici e selvatici (Guberti et al., 2002) in relazione alle caratteristiche del territorio, alle tipologie degli allevamenti e alla gestione del patrimonio faunistico (Elbers et al., 2000). In questo contesto un programma di controllo sanitario assume una considerevole importanza al fine di prevenire problemi sanitari e zoonosici, nell'ottica di una corretta gestione e di un uso sostenibile del territorio (Guberti et al., 2002).

Il cinghiale, selvatico prettamente forestale, è in grado di adattarsi a quasi tutti gli ecosistemi (Artois et al., 2002), diffondendosi nell'ultimo decennio in ogni regione del nostro Paese, Sicilia esclusa, con una maggiore presenza sul versante occidentale della penisola, specie nel settore centrale (Toscana – Umbria – Alto Lazio). Nonostante la sua ampia diffusione nel nostro Paese, vita ed abitudini del cinghiale rimangono in gran parte sconosciute, anche perché, essendo di rara osservazione il suo studio nell'ambiente naturale non è semplice. La pratica dell'allevamento brado dei maiali domestici e l'introduzione, per scopi venatori, di cinghiali originari del centro Europa o dei Balcani ha comportato la comparsa di una nuova tipologia di cinghiali più grossi, più prolifici e più resistenti agli eventi climatici, dei cinghiali originari. Ciò ha portato conseguenze molto dannose per l'agricoltura oltre al fatto che la promiscuità dell'allevamento brado con la popolazione di selvatici può essere fonte di rischio sanitario per gli allevamenti (Guberti et al., 2002; Romero et al., 2001).

Infatti, indagini svolte hanno evidenziato che le popolazioni di cinghiali possono essere colpite da malattie come tubercolosi, brucellosi, pseudorabbia, circovirosi tutte segnalate sia attraverso indagini sierologiche che talvolta con l'isolamento dell'agente eziologico (Muller et al., 1998, Schultze et al. 2004), che potrebbero anche avere importanza nell'ambito della sanità pubblica veterinaria (Giovannini et al., 1988).

2. LA MALATTIA DI AUJESZKY O PSEUDORABBIA.

2.1. Etiologia

Nel 1902 A. Aujeszky descrisse una nuova malattia che causava disturbi nervosi distinta dalla rabbia. Questa entità morbosa fu definita in Europa “Morbo di Aujeszky” mentre nel nuovo continente fu preferito il nome di “Pseudorabbia” per distinguerla appunto dalla malattia causata dal *Rabdovirus* agente infettivo della rabbia.

Nel 1910, Schmeidhofer, dimostrò tramite prove di filtrazione su lisati cellulari di animali infetti che la patologia, così come la rabbia, era causata da un agente di natura virale. Il virus fu classificato nel 1934 da Sabin e Wright come appartenente al genere *Herpesvirus*. Il Comitato Internazionale per la Tassonomia dei Virus classificò successivamente l' Aujeszky Disease Virus (ADV) come appartenente alla sottofamiglia *alphaherpesvirinae*.

Sebbene il suino sia l'ospite naturale del virus, definito anche PRV (Pseudorabies Virus) molti altri animali possono fungere da ospiti accidentali e venire infettati da questo, è nel suino comunque che le manifestazioni morbose possono esplicarsi con una varietà di quadri clinici. Il decorso clinico è prevalentemente determinato da una parte dall'età del soggetto infettato e dal suo stato immunologico , dall'altra dalla virulenza del ceppo e dalla dose infettante.

La malattia si esplica in modo grave in popolazioni che non sono mai venute in contatto con PRV ed in particolar modo nei suinetti dove la mortalità si attesta sul 100% nelle prime 2 settimane di vita, abbassandosi però al 50 % nella terza e quarta settimana.

Nei suinetti inoltre si osservano diversi sintomi neurologici al contrario degli animali adulti che mostrano ipertermia, mancanza di appetito, tosse, e dispnea marcata.

Negli adulti la mortalità è generalmente inferiore al 5%.

Nei verri e nelle scrofe si possono osservare anche disturbi della fertilità, solitamente correlati a periorchiti e metriti che possono portare ad infertilità e ad aborto gli animali.

2.2 Classificazione

PRV ha la tipica architettura dei virioni appartenenti al genere Herpesvirus. Le particelle virali mostrano una conformazione pressoché sferica con un diametro di 150-180 nm con un core centrale circondato da tre strati.

Il core del virus contiene acido desossi-ribo-nucleico organizzato in doppio filamento con una lunghezza approssimativa di 140 Kb. Il capside ha natura proteica ed è organizzato in simmetria icosaedrica.

Il virus presenta anche un envelope che riveste l'intera particella formato da un doppio strato fosfolipidico nel quale sono incluse le proiezioni esterne del virus di natura glicoproteica.

2.3 Epidemiologia

La pseudorabbia è una affezione principalmente del suino, serbatoio e fonte più importante di infezione naturale per un ampio gruppo di ospiti secondari che comprendono bovini, pecore, capre, cani, gatti e molte specie animali selvatiche (Thedford e Wright, 1980). A motivo dell'evoluzione e dell'esito della malattia, tutte le specie animali diverse dai suidi sono considerate 'fondi ciechi epidemiologici, che però potrebbero contenere il virus e diffonderlo se mangiati da carnivori o altri animali selvatici.

L'infezione da PRV diffonde lentamente e prevalentemente per contagio diretto naso-naso o per via oro-fecale, ma può anche avvenire attraverso alimenti contaminati, acqua, ingestione di tessuti infetti o attraverso calzature, abiti e veicoli contaminati. Trasmissione indiretta avviene solitamente per inalazione di virus in aerosol. Il virus può rimanere infettante fino a 7 ore nell'aria con umidità relativa $\geq 55\%$. Esperienze condotte in Gran Bretagna, Danimarca e USA indicherebbero che il virus può viaggiare via aerosol fino a 2 km di distanza. Oltre che per via respiratoria, la trasmissione può realizzarsi anche

attraverso il latte delle scrofe infette, il seme del verro (anche se impiegato per una sola inseminazione artificiale) e per via diaplacentare.

Una fonte insidiosa d'infezione sono i suini convalescenti, malati cronici ed infetti in forma latente, che si possono conservare a lungo eliminatori. L'infezione latente da herpesvirus può essere definita come fase di persistenza del virus nell'ospite non associata a replicazione né a reazione immunitaria (Thedford e Wright, 1980). In suini con infezione latente, a seguito di condizioni stressanti quali il parto, sovraffollamento o trasporti, possono riprendere la moltiplicazione e dell'eliminazione virale, non sempre associate alla comparsa della sintomatologia clinica.

Altri studi hanno dimostrato che il virus può sopravvivere fino a 7 ore in acque di pozzo non clorate, per due giorni negli effluenti di vasconi di decantazione così come nell'erba verde, nel terreno, nelle feci e nelle granaglie, per tre giorni nei liquidi di lavaggio nasale, sulla plastica e sul mangime pellettato, per quattro giorni nella lettiera di paglia. Il virus è munito di envelope e per questo è inattivato dall'essiccamento, la luce solare diretta, dalle alte temperature e a tutti i solventi che sciolgono i grassi.

La malattia, prima degli anni '60, risultava localizzata nell'Europa orientale, ma dal 1989 ha avuto una distribuzione mondiale raggiungendo 43 Paesi (<http://WWW.Defra.gov.uk/animalh/diseases/notifiable/disease/aujeszkys.1989>). Ci sono diverse ragioni per spiegare l'aumentata incidenza della malattia: lo sviluppo, negli ultimi decenni, di ceppi nuovi e più virulenti; i miglioramenti nelle tecniche diagnostiche con l'identificazione dei casi di pseudorabbia precedentemente diagnosticati come peste suina; e cambiamenti nella gestione dell'allevamento suino, con confinamento di molti animali in ambienti chiusi e dove i parti si succedono a ciclo continuo.

Ospiti a fondo cieco, come il cane, gatto, ma anche ratti e altri roditori selvatici sopravvivono solo 2-3 giorni dall'infezione e possono trasmettere il virus tra le aziende se

mangiati da altri suini. Il ruolo degli insetti come potenziali vettori è oggetto di indagine. Uccelli non sembrano ricoprire alcun ruolo nella trasmissione.

Il virus della pseudorabbia è stato isolato da cinghiali in Texas e Florida e la positività sierologica è stata dimostrata in numerosi paesi Europei, Italia compresa. La diffusione del virus dal cinghiale al bestiame domestico è stata riportata in numerose occasioni in Florida e Texas, dove è stata sospettata la contaminazione da parte di cinghiali di foraggio distribuito a bovini sul terreno. Questa trasmissione dal cinghiale a bestiame domestico è vista come un serio ostacolo ai programmi di eradicazione della malattia (<http://texnat.tamu.edu/symposia/feral/feral-12.htm> 1993).

L'unico metodo di controllo della pseudorabbia nei selvatici è a tutt'oggi il controllo della popolazione.

2.4 Patogenesi

2.4.1 Ingresso del virus nella cellula

PRV si replica all'interno delle cellule suscettibili alla sua infezione tramite l'aggancio del virione alla membrana cellulare e la conseguente fusione della membrana stessa con quella dell'envelope virale.

Ad oggi si è arrivati alla caratterizzazione di 7 glicoproteine dell'envelope virale (*gB*, *gC*, *gD*, *gE*, *gH*, *gI* e *gL*) che giocano un ruolo fondamentale nell'adesione e nell'adsorbimento del virus alla cellula.

Il primo contatto del virus con la cellula ospite è mediato dalla glicoproteina *gC* che si lega alle molecole di eparan-solfato (*HS*) presenti sulla superficie cellulare (Mettenleiter et al., 1990). L'interazione *gC-HS* viene inoltre modulata per mezzo della glicoproteina *gD* la quale converte rapidamente la bassa affinità di legame *HS*-dipendente in un legame più stabile *HS*-indipendente (Karger and Mettenleiter, 1993). La stabilità di legame della particella virale alla cellula infettata è fondamentale e necessaria per la successiva serie di

processi che portano alla definitiva fusione dell'envelope con la membrana cellulare. Le quattro glicoproteine *gB*, *gD*, *gH* e *gL* formanti un complesso, ed in combinazione singolarmente con *gH* e *gL* mostrano di essere attive durante il processo di penetrazione nella cellula (Rauh and Mettenleiter, 1991; Peeters et al., 1992; Peeters et al., 1992; Klupp et al., 1992; Klupp et al., 1994) anche se la precisa sequenza delle cascate che porta alla formazione del complesso proteico non è stata ancora chiarita. Nonostante ciò, si è arrivati alla conclusione che *gB*, *gD* e *gH* sono indispensabili per il processo di ingresso nella cellula, mentre *gC* non risulta fondamentale per questo.

2.4.2 Replicazione virale

Le modalità per cui il capsido si disintegra ed il materiale genomico raggiunge il nucleo non sono ancora perfettamente comprese.

Una volta che il DNA di PRV viene a trovarsi all'interno del nucleo inizia la sua trascrizione.

I primi geni ad essere trascritti vengono indicati con il nome di *IE* (Immediate-Early). Fino ad oggi soltanto uno dei geni *IE* è stato identificato. Questo gene, nominato *IE180* (Cheung et al., 1990) codifica per una proteina che a sua volta riconosce specifiche sequenze del genoma virale e porta alla trascrizione di un altro gruppo di geni denominati geni *E* (Early) (Workman et al., 1988).

Questi codificano per un gruppo di proteine che sono attive durante la sintesi del DNA. L'ultimo gruppo di geni espressi, codifica principalmente per glicoproteine strutturali. Una volta che sono stati prodotti tutti i componenti strutturali, le nuove particelle virali vengono assemblate tramite passaggio attraverso la membrana nucleare interna (Pol, 1990). I neovirioni passano quindi attraverso il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi e quindi secreti all'esterno della cellula.

Il rilascio del virus all'esterno della cellula è influenzato dalle glicoproteine *gC*, *gE* e *gI* (Schreurs et al., 1988 Zsak et al., 1989). La produzione del virus è stata studiata in diverse

linee cellulari dove la produzione di nuove particelle virali appare evidente già 5 ore post-inoculazione (PI) (Nauwynck, 1993).

I titoli del virus quindi crescono rapidamente 7 ore PI raggiungendo il valore di $10^{7.5}$ TCID₅₀ per 10^6 cellule inoculate.

2.4.3 Diffusione diretta del virus da cellula a cellula

Un'importante ed alternativa via di infezione tramite il liquido extracellulare è quella della trasmissione diretta del virus da cellula a cellula dopo fusione delle membrane cellulari. Prima però che la fusione e quindi il passaggio del virus possa avvenire, le cellule devono essere in contatto l'una con l'altra. Sia l'adesione tra cellule che la fusione delle membrane è mediata dalle glicoproteine dell' envelope virale che cominciano ad essere espresse sulla superficie delle cellule già 5 ore PI raggiungendo un massimo 11 ore PI. Le principali glicoproteine coinvolte nel processo di adesione cellulare sono *gB*, *gC* ed in grado minore *gD* (Nauwynck, 1993). Una volta che le cellule sono in contatto può partire il processo di fusione (Hanssens et al., 1993) in cui le glicoproteine coinvolte sono principalmente *gB* e *gH*, in maniera minore *gD* e *gE*, mentre *gC* non è coinvolta (Peeters et al., 1992a, Peeters et al., 1992b; Rauh and Mettenleiter, 1991; Zsak et al., 1992).

2.4.4 Interazioni virus-ospite in assenza di immunità' specifica

La virulenza di PRV è determinata dalla sua capacità di replicarsi ed invadere le cellule del suino. Il sito primario di replicazione virale è senza dubbio l'epitelio delle cavità nasali, le tonsille palatine, l'epitelio della faringe e dei polmoni (Sabo et al., 1968; Sabo et al., 1969; Wittmann et al., 1980; Miry and Pensaert, 1989; Pol, 1990; Kritas et al., 1994a; Kritas et al., 1994b). Dopo la replicazione a livello delle cellule epiteliali dei suddetti apparati, il virus diffonde nel connettivo sottostante in breve tempo. 24 ore PI, l'antigene virale può essere già ritrovato in gruppi di cellule epiteliali, fibrociti e cellule nervose. 48

ore PI l'antigene virale viene riscontrato in larghe placche che vanno incontro precocemente a necrosi e che si estendono sopra gli epitelii interessati, il connettivo sottostante, le cellule nervose e persino l'endotelio dei vasi sanguigni e linfatici della zona sito di replicazione.

Il virus a questo punto può diffondersi dal sito primario di inoculazione a tutti i livelli guadagnando il torrente ematico, la circolazione linfatica o transitando passivamente lungo gli assoni dei nervi periferici.

La replicazione virale a livello dei siti secondari come linfonodi drenanti, milza, bulbi olfattori, reni, ovaie ed utero inizia pressoché 48 ore PI.

Nonostante la presenza di immunità di tipo sia umorale che cellulare mediata, il virus può essere isolato dalle tonsille dal 18° giorno PI (Sabo et al., 1969) e dai secreti nasali dal 13° giorno PI (Pensaert et al., 1990; Vannier et al., 1990).

Il ruolo che giocano nel processo di replicazione le glicoproteine virali è stato studiato ed interpretato tramite esperimenti di delezione sui geni codificanti le suddette proteine creando dei ceppi mutati mancanti appunto di una o delle altre proteine.

RUOLO DELLA GLICOPROTEINA gC

Esistono pochi dati in merito alla delezione della suddetta proteina e quindi sul suo ruolo nella virulenza e replicazione negli animali in vita.

Si è osservato comunque che non c'era differenza in suinetti appena nati mentre la virulenza era ridotta in animali di 3 settimane di vita (Mettenleiter et al., 1989; Kritas et al., 1994a; Kritas et al., 1994b).

In che modo l'età influenzi la virulenza è tutt'ora oscuro.

RUOLO DELLA GLICOPROTEINA gD

Tramite studi di delezione della glicoproteina *gD* il suo ruolo è stato ben definito e studiato (Mulder et al., 1995). Risulta infatti che il virus mancante di tale proteina ha minor affinità

verso i tessuti nervosi e quindi maggior lentezza nel raggiungere in S.N.C. dalla periferia non potendo più servirsi della via nervosa ma soltanto di quella ematica o linfatica.

RUOLO DELLA GLICOPROTEINA *gI*

La glicoproteina virale *gE* forma un complesso non covalentemente legato con la proteina *gI* che viene espresso sulle membrane delle cellule infette ed è presente sull'envelope virale. L'assenza completa della proteina *gE* o la delezione di soli 2 aminoacidi risulta in una riduzione della virulenza di PRV (Jacobs et al., 1993; Kritas et al., 1994a; Kritas et al., 1994b).

Dopo una somministrazione intranasale infatti sono assenti i disturbi nervosi, l'anoressia, l'ipertemia ed i suini non decedono come dopo somministrazione di virus non deleto. La riduzione della virulenza può essere spiegata con la diminuita capacità di PRV di invadere le strutture nervose a diversi livelli. Nonostante l'infezione sperimentale con mutanti *gE* dia un numero simile all'infezione con ceppi selvaggi, di foci necrotici a livello dell'epitelio nasale già 48 ore PI, questi si spingono meno in profondità evitando le strutture vascolari e nervose.

La spiegazione per questo comportamento può essere data con la minor efficienza nel rilascio e nella diffusione da cellula a cellula dei ceppi *gE*.

I mutanti mostrano inoltre anche una minor capacità di diffusione attraverso il sistema nervoso. Questo è stato dimostrato per entrambe le vie olfattiva e del trigemino. Un numero infatti estremamente minore di cellule nervose infette è stato dimostrato con ceppi *gE* a livello delle strutture nervose distali mentre non era possibile riscontrare nessun segno di infezione livello centrale. La minor capacità di invadere il sistema nervoso è probabilmente dovuta ad un insieme di fattori quali la minor estensione delle placche necrotiche a livello della mucosa nasale che causano a loro volta un minor coinvolgimento di strutture sottostanti tra cui le terminazioni nervose. Ancora si possono considerare la

minor capacità di diffusione del virus da cellula a cellula ed un deficiente trasporto anterogrado tramite gli assoni come dimostrato lungo il decorso del nervo trigemino (Kritas et al., 1995). A livello generale si è inoltre dimostrato come anche in altri organi come fegato, reni, ghiandole surrenali e milza la concentrazione di mutanti *gE* sia nettamente minore rispetto al ceppo selvaggio. Possiamo pertanto concludere come la glicoproteina *gE* rivesta un ruolo fondamentale nella virulenza di PRV e nella sua capacità di invasione nell'animale in vita.

RUOLO DELLA GLICOPROTEINA *gI*

PRV privato della proteina *gI* può replicarsi nella mucosa nasale alla stessa maniera del ceppo selvaggio (Kritas et al., 1994a,b). Nonostante questo mutante possa invadere il S.N.C. lungo il decorso dei nervi periferici (olfattivo e trigemino) l'entità dell'infezione ed i danni a livello nervoso sono nettamente inferiori rispetto all'infezione primitiva. Per quanto riguarda quindi la virulenza, i mutanti *gI* hanno una posizione intermedia tra il ceppo selvaggio ed i mutanti *gE*. Questo dato indica che sebbene *gE/gI* formino un complesso, la loro conformazione non è fondamentale per ogni funzione virale e che la glicoproteina *gE* è in grado di compiere diverse funzioni in assenza di *gI*.

RUOLO DI ALTRE PROTEINE VIRALI

La delezione del gene che codifica per *gG* o per *28K*, due proteine il cui ruolo non è ancora stato ben identificato, non influenza la virulenza e la replicazione nei suini (Kimman et al., 1992), indicando il ruolo minore svolto da queste due proteine. Il mutante *US3* che non esprime la protein-chinasi *PK(US3)* dimostra una diminuita virulenza nell'infezione in vivo (Kimman, 1994a; Kimman, 1994b).

PK(US3) ha dimostrato avere invece capacità fosforilativa nei confronti di una delle maggiori fosfoproteine virali (112 kDa) (Zhang et al., 1990). Nonostante la funzione della

suddetta fosfoproteina sia sconosciuta, questa risulta necessaria nella replicazione in vitro del virus. Nessun dato è invece disponibile sugli effetti della delezione di un gene codificante per un'altra protein-chinasi *PK(UL13)*. Il ruolo giocato da due enzimi virali, Timidin-chinasi (TK) e Ribonucleotide-reduttasi (RR), coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici, è stato accuratamente studiato. RR infatti riduce i ribonucleotidi-di-fosfati a desossi-prodotti che possono venire impiegati nella sintesi di DNA virale. TK è necessaria invece per la fosforilazione della desossi-timidina al suo prodotto monofosfato corrispondente. E' chiaro pertanto, considerando le funzione dei due suddetti enzimi, la ridotta virulenza che hanno i mutanti *TK* ed *RR*⁻ nell'infezione in vivo del suino (Kit et al., 1985; de Wind et al., 1993).

2.4.5 Interazione virus ospite in presenza di immunita' specifica

Il grado in cui la replicazione virale può essere tenuta sotto controllo nel suino dipende dalla situazione immunitaria dell'animale. Nonostante una inibizione totale alla replicazione possa essere riscontrata a livello delle cavità nasali e della faringe in suini reinfettati 1 o 2 mesi dopo la prima inoculazione, l'antigene virale può essere ritrovato in un certo numero di cellule alveolari nel polmone (Miry e Pensaert, 1989). Da queste dati è stato ipotizzato che in prima istanza siano i macrofagi alveolari ad infettarsi e quindi a trasmettere il virus all'epitelio alveolare e al connettivo sottostante tramite contatto diretto tra cellula e cellula. In suini immunizzati tramite vaccino la protezione immunitaria è meno efficiente rispetto all'infezione naturale poiché l'antigene virale non solo viene riscontrato a livello respiratorio profondo ma anche nell'epitelio delle cavità nasali, tonsille e faringe (Miry e Pensaert, 1989; Wittmann et al., 1980). Nonostante la presenza di immunità vaccinale, si può sempre ritrovare una viremia cellulo-associata (Wittmann et al., 1980). Questo permette a PRV di raggiungere organi profondi ed in caso di gravidanza anche la placenta dove esplica azione lesiva che si può concludere in interruzione della gestazione ed aborto (

Nauwynck e Pensaert. 1992). Una volta infatti raggiunta la circolazione uterina, i leucociti veicolanti il virus, aderiscono ai vasi sia tramite processi fisiologici sia tramite l'espressione delle glicoproteine virali sulla superficie cellulare.

Dopo l'adesione dei leucociti ai vasi placentari, PRV è capace di diffondere, sempre in associazione a queste cellule, attraverso l'endotelio, lo strato di fibrociti e quindi l'epitelio uterino (Hanssens et al., 1993).

Con questo meccanismo patogenetico definito a "cavallo di troia", il virus, anche in presenza di immunità vaccinale può essere veicolato per via ematica e linfatica nell'organismo e quindi passare intatto, nelle scrofe, attraverso la barriera placentare dove esplica la sua azione patogena sul feto con conseguenze spesso fatali per questo.

2.5 Sintomatologia

Nella specie suina il quadro clinico dipende dallo stivite virale coinvolto, dalla dose infettante e soprattutto dall'età dei colpiti. I suinetti sono molto suscettibili, e le perdite possono raggiungere il 100% in quelli con meno di 7 giorni dove, in generale, sono osservati segni di malattia del sistema nervoso centrale (tremori, pedalamento). La sintomatologia nervosa, pur essendo occasionalmente segnalata in soggetti in fase di magronaggio/ingrasso, è propria dei lattonzoli e dei suinetti appena svezzati. Inizialmente, i suinetti mostrano astenia, anoressia e ipertermia (41 °C). I sintomi neurologici possono già manifestarsi nelle prime 24 h con tremori, scialorrea, atassia, nistagmo, opistotono, gravi crisi convulsive epilettiformi. E' anche possibile la paralisi del treno posteriore con caratteristica posizione di cane seduto, o movimenti di rotazione su se stessi con pedale di tutti gli arti. Il prurito, costantemente presente nelle altre specie sensibili, si manifesta molto raramente nel suino. Nella maggior parte dei casi la morte sopraggiunge nell'arco di 24-36 ore.

Nei maialetti già svezzati i sintomi respiratori sono il principale problema clinico, soprattutto per il sopraggiungere di complicazioni da germi di irruzione secondaria. E' stato riportato che il virus della pseudorabbia inibisce la funzionalità dei macrofagi alveolari riducendo così la loro abilità a spostarsi e distruggere i batteri. Nei suini magroni e nei grassi, la forma respiratoria spesso poco pronunciata dal punto di vista clinico, talvolta confusa con altre patologie, oppure comunemente definita 'sindrome influenzale', è in grado di condizionare altre infezioni respiratorie, con perdite rilevanti in termini di incremento ponderale. E' caratterizzata da elevata morbilità (anche 100%) e, in assenza di complicazioni, bassa mortalità (1-2%). La sintomatologia compare dopo un periodo di incubazione di 3-6 giorni con ipertermia (41-42 °C), depressione, anoressia, grave rinite con starnuti e secrezione nasale, che evolve in polmonite con tosse secca e dispnea. Occasionali sono i casi di coinvolgimento del sistema nervoso centrale. L'evoluzione della malattia in allevamento è estremamente variabile con forme che diffondono rapidamente a tutti i suini presenti indipendentemente dall'età e forme inapparenti, diagnosticabili solo sierologicamente.

Nei riproduttori oltre alle manifestazioni respiratorie, compaiono disturbi della sfera riproduttiva: nei verri è possibile osservare edema scrotale ed azospermia totale o parziale; nella scrofa i sintomi variano a seconda del momento dell'infezione, se si infetta nel primo terzo di gravidanza, può riassorbire gli embrioni e ritornare in estro, mentre nel secondo e terzo periodo della gestazione i sintomi vanno dall'aborto alla natimortalità.

2.6 Lesioni anatomo patologiche

Nei suini colpiti dalla **forma nervosa**, le lesioni macroscopiche sono spesso assenti o poco significative, e si limitano alla iperemia delle meningi, aumento del liquido cefalo-rachidiano, congestione della mucosa naso faringea, tonsillite, necrosi puntiforme epatica e splenica. Sempre presenti, anche in suini asintomatici, le lesioni microscopiche a carico

del SNC. I reperti istologici più frequenti sono la meningoencefalite non suppurativa e la ganglioneurite, che possono coinvolgere tanto la sostanza grigia quanto la bianca a seconda della via di ingresso del virus. E' stata anche osservata la presenza di manicotti perivascolari di monociti, necrosi neuronale e ispessimento delle meningi per infiltrazione monocitica. Tipica, oltre alla comparsa di focolai di necrosi carioretica, la comparsa di grossi inclusi nucleari.

Negli altri mammiferi, le sole lesioni macroscopicamente apprezzabili sono quelle traumatiche indotte dal prurito; i reperti istologici non differiscono da quelli che si riscontrano nel suino.

La **forma respiratoria** è caratterizzata dalla flogosi della mucosa delle prime vie respiratorie e dalla comparsa di ampi focolai polmonari di consolidazione, soprattutto a livello dei lobi craniali e del lobo cardiaco. Il quadro istologico consiste in una bronchiolo-alveolite necrotizzante, con essudazione alveolare fibrinosa ed emorragica. Nelle prime fasi dell'infezione è anche possibile notare la presenza di tipici inclusi nucleari all'interno delle cellule epiteliali. Nelle razze a cute chiara è frequente la cheratocongiuntivite.

Nelle **scrofe** l'aborto è seguito da una leggera flogosi della mucosa uterina che si presenta edematosa. I feti abortiti, se non mummificati, presentano edema sottocutaneo, versamenti essudatizi nelle cavità splancniche, necrosi puntiforme epatica e splenica, focolai necrotici polmonari e tonsillari.

Nei **verri** è possibile osservare lesioni degenerativo necrotiche a carico dei tubuli seminiferi, della tunica albuginea del testicolo e la presenza di spermatozoi anomali, che potrebbero anche essere una conseguenza dell'ipertermia.

A livello epatico, PRV, come altri virus erpetici, è in grado di produrre focolai necrotici (2-3 mm di diametro) sparsi su tutta la superficie. Queste lesioni sono più tipicamente ritrovate in soggetti giovani (< 7 giorni). Nel suino, ma anche nel bovino, nel cane e nel gatto, si possono inoltre osservare fenomeni di miocardite non purulenta, di tipo interstiziale, con

focolai di necrosi. Altre lesioni possibili sono la gastrite catarrale acuta e l'enterite emorragica.

Lesioni macroscopiche da virus della pseudorabbia sono spesso invisibili. Si possono ritrovare rinite sierosa, tonsillite necrotica o emorragie ai linfonodi polmonari e talvolta edema polmonare e lesioni polmonari secondarie a batteri patogeni.

2.7 Diagnosi

La diagnosi clinica è relativamente semplice solo nei mammiferi diversi dal suino, l'isolamento del virus consente una diagnosi nel caso di forme fatali della malattia o forme cliniche dei maiali, mentre altre tecniche e test sierologici sono richiesti per la diagnosi delle forme latenti.

Nella specie suina, il rilievo clinico deve necessariamente essere integrato da una accurata indagine anamnestica, dall'esame necroscopico e da specifici esami di laboratorio. L'esame istologico può essere molto utile, ma solo le indagini di laboratorio, dirette e indirette, costituiscono elementi di certezza.

Prove dirette cercano di mettere in evidenza il virus mediante isolamento su substrati cellulari e/o dimostrazione dell'antigene presente nei campioni. La natura dell'antigene virale può essere dimostrata con test immunoenzimatici (ELISA, immunoperossidasi), prove di immunofluorescenza diretta, siero neutralizzazione. Rientrano tra le prove dirette anche quelle che, attraverso reazioni di amplificazione del genoma (Polymerase Chain Reaction) o l'impiego di sonde a DNA (tecniche di ibridazione in situ), si prefiggono di dimostrare la presenza del genoma virale.

Cervello, milza, e polmoni sono gli organi di scelta per isolamento virale. Tamponi nasali possono essere utilizzati per l'isolamento virale solamente in caso di soggetti in fase di infezione acuta. Il test di immunofluorescenza si può fare su tonsille o cervello.

Le prove indirette svelano la reazione immunitaria specifica dell'ospite nei confronti dell'agente virale, tuttavia molti animali colpiti non vivono abbastanza a lungo per produrre una marcata risposta anticorpale. Sono quindi praticabili solo nella specie suina e vengono prevalentemente utilizzate a fini epidemiologici, piuttosto che diagnostici. Ogni tecnica sierologia usata dovrebbe essere sufficientemente sensibile per dare un risultato positivo con il siero standard internazionale di referenza dell'OIE. In caso di commercio internazionale, il test dovrebbe essere abbastanza sensibile per reagire con il siero standard diluito $\frac{1}{2}$.

Il test di sieroneutralizzazione è stato riconosciuto come metodo di referenza per la sierologia, anche se, per motivi di diagnosi generale e per comodità in caso di analisi su larga scala, è stato ampiamente rimpiazzato dal test ELISA (<http://WWW.oie.int/eng/normes> 2000), che può tuttavia avere scarsa specificità. Risultati falsi positivi sono riesaminati con un test di sieroneutralizzazione. Anche la sieroagglutinazione in latex, nonostante sia un test sensibile e rapido, ha poca specificità. Questo test permette di ritrovare gli anticorpi specifici dopo 6-7 giorni dall'infezione, utilizzando l' ELISA ne occorrono 7-8 e con la sieroneutralizzazione 8-10. Anticorpi colostrali per la pseudorabbia possono essere presenti fino a 4 mesi di età.

2.8 Profilassi

2.8.1. Azione immuogena delle glicoproteine di PRV

Da quanto descritto fin ora risulta chiaro come le diverse glicoproteine virali sono responsabili di importanti interazioni tra PRV e le cellule dell'ospite. Pertanto non sorprende che l'immunità indotta da queste specifiche glicoproteine è molto efficace nella protezione del suino, non solo clinicamente ma anche virologicamente. L'immunità specifica verso le glicoproteine dell'envelope consiste di due meccanismi: l'immunità umorale specifica e quella cellulare mediata da linfociti T citotossici. Per quanto riguarda

gli anticorpi, questi possono agire singolarmente (via diretta) o mediare attività antivirali tramite l'attivazione del sistema complemento o per mezzo dell'interazione con cellule immunitarie come i leucociti (via indiretta).

Gli effetti diretti vengono ottenuti tramite l'azione competitiva sui siti di legame delle glicoproteine durante l'ingresso del virus, l'adesione cellulare e la fusione delle cellule infettate. E' stato inoltre dimostrato che alcuni anticorpi sia di natura monoclonale che policlonale diretti contro *gB*, *gC* e *gD*, bloccano PRV anche in assenza del sistema complemento (Wathen et al., 1985; Ben-Porat et al., 1986; Eloit et al., 1990; Marchioli et al., 1988; Coe e Mengeling, 1990), che sieri monoclonali specifici per le glicoproteine *gB* e *gC*, inibiscono l'adesione virale in cellule infettate (Hanssens et al., 1993) ed infine che anticorpi monoclonali diretti verso *gB*, *gD* e *gE*, riducono la larghezza delle placche di lisi in monostrati cellulari in coltura (Nauwynck e Pensaert, 1995b). Gli effetti indiretti della reazione immunitaria sono possibili non solo attraverso l'azione dei suddetti anticorpi ma anche tramite l'azione di anticorpi diretti verso regioni inattive delle glicoproteine dell'envelope. Inoltre il legame degli anticorpi (IgG, IgM) può attivare il sistema complemento, causando un danno alla membrana in cui sono ancorate le glicoproteine dell'envelope e questo può a sua volta portare a lisi cellulare, liberazione del virus in ambiente extracellulare con conseguente attivazione di questo. Questo è il motivo per cui anticorpi monoclonali non neutralizzanti e diretti verso *gB*, *gC*, *gD* e *gE*, possono concorrere alla clearance virale in presenza delle frazioni del sistema complemento (Wathen et al., 1985; Fuchs et al., 1990; Nakamura et al., 1990). Gli anticorpi una volta legati alle frazioni delle glicoproteine espresse sulla superficie delle cellule infette, possono causare la morte cellulare anche tramite l'interazione con i recettori Fc espressi dai fagociti (monociti, macrofagi e granulociti neutrofili). Nonostante sia provata l'esistenza di anticorpi diretti verso altre proteine virali come *gG* o *IEP180*, questi risultano immunologicamente di scarsa importanza. Il motivo di questo può essere spiegato con il

fatto che le proteine in questione svolgono la loro attività e vengono espresse all'interno delle cellule infette risultando quindi irraggiungibili dai corrispondenti anticorpi (Zuckerman et al., 1990).

3 I CIRCOVIRUS SUINI

3.1 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.

3.2 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.

3.3 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 infettati 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 immunofluorescenza 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 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.

3.4 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 postmortem. 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 antigene virale. 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 linfoistiocitario. 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 obliterato 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 postsvezzamento", 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 gastrointestinale 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 trasmurale. 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 dutturale 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 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 necropsopia, 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.

3.5 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 associate 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.

4 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 (2004) 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.

5. MATERIALI E METODI.

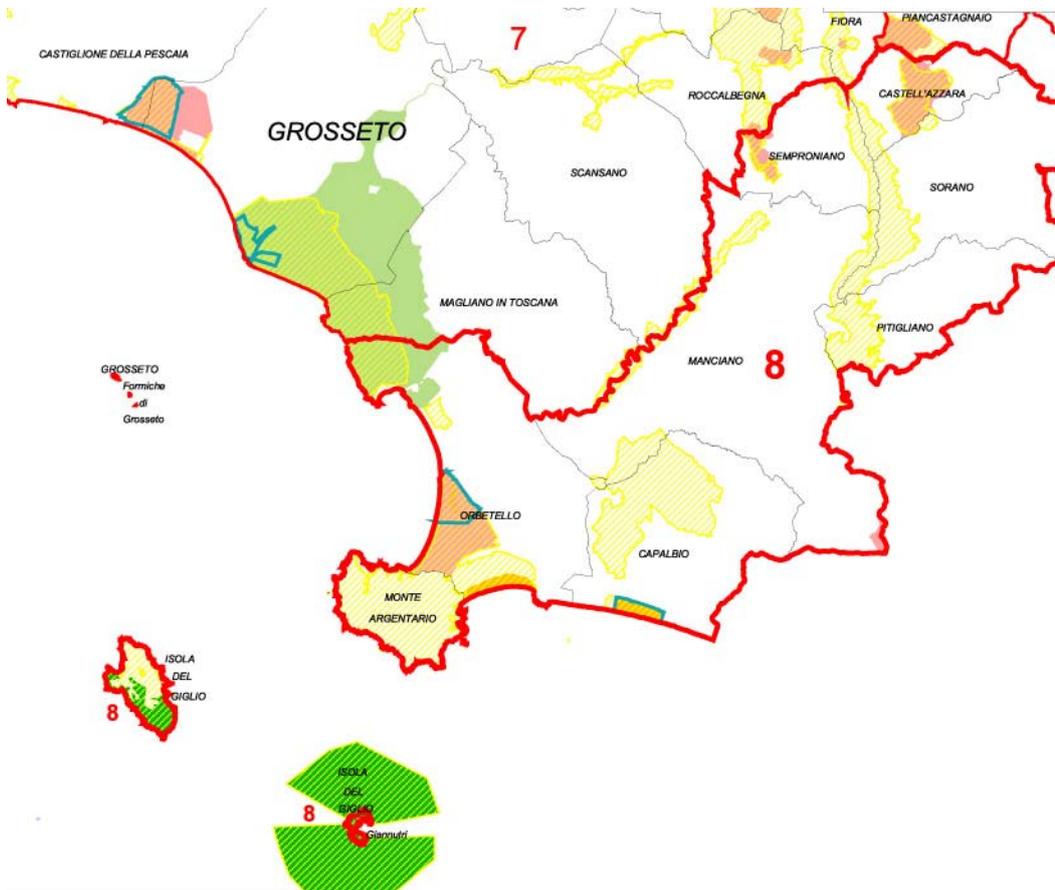
5.1. Raccolta e processazione dei campioni

Per lo studio sono stati esaminati 245 cinghiali regolarmente abbattuti nelle Province di Grosseto e di Pisa durante l'attività venatoria .

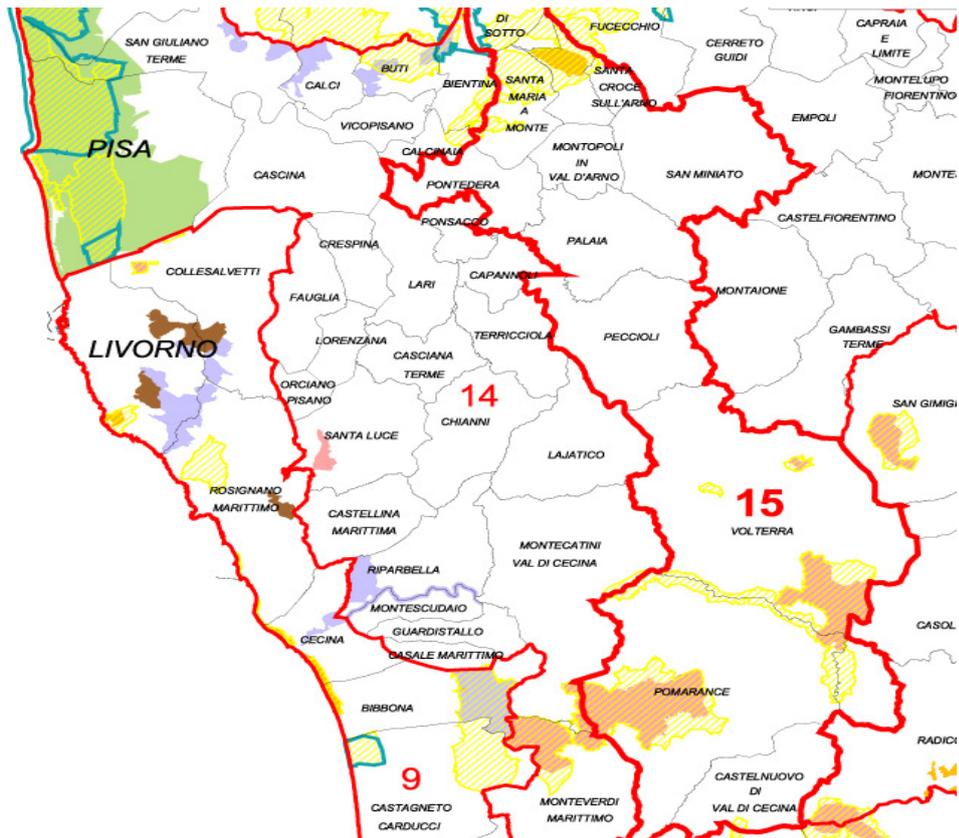
I campioni sono stati raccolti alla fine delle battute di caccia negli ambiti territoriali ATC 7, ATC 8 , ATC 14 ed ATC15. Il campionamento consisteva nel prelevare da ogni singolo cinghiale porzioni di tessuto tonsillare (tonsille palatine), linfonodale tra cui i linfonodi retromandibolari, polmonari, inguinali, ed un campione di sangue. In attesa di poter effettuare le analisi, i vari tessuti sono stati conservati in formalina e porzioni di tutte le tonsille sono state congelate a -20 °C per indagini di biologia molecolare. Il sangue è stato invece centrifugato ed il siero conservato a – 20 °C per le successive indagini immunoenzimatiche.

I campioni, per essere ben riconoscibili, erano accompagnati da schede numerate progressivamente che contenevano: la data del campionamento, le informazioni sulla provenienza e le caratteristiche dell'animale abbattuto (ATC, comune, località, frazione, sesso, età e peso).

Dei 245 soggetti esaminati 111 erano maschi e 134 erano femmine. Centosessanta soggetti avevano un'età maggiore di un anno, mentre 85 animali avevano un'età minore di un anno (tabella 1) . L'età dei soggetti è stata valutata tramite lo studio delle tavole dentarie, definendo le due classi di età in base alla presenza di tre o due creste sul quarto premolare inferiore per identificare animali sotto un anno di età o sopra rispettivamente.



Cartina delle aree campionate: ATC 7,8



Cartina delle aree campionate: ATC 14, 15

Cinghiali	245
Maschi	111
Femmine	134
≤ 1 anno	85
> 1 anno	160

Tabella 1: Animali campionati divisi per età e sesso.

5.2 Indagini istopatologiche ed istochimiche

Da tutti i soggetti è stato possibile prelevare campioni di tonsilla palatina e 200 campioni di linfonodi. Porzioni rappresentative dei tessuti prelevati sono state fissate in formalina tamponata al 10%, pH 7,4 e incluse in paraffina seguendo le normali metodiche. Sezioni di 5 micron sono state colorate con ematossilina-eosina (E-E). In tutti i casi sono state effettuate colorazioni specifiche per evidenziare la presenza di miceti (PAS e Grocott) e batteri alcool acidi resistenti (Ziehl-Neelsen). Ulteriori sezioni sono state utilizzate per l'indagine di immunocistochimica.

Tessuti	E-E	PAS	Grocott	Ziehl Neelsen
Tonsille palatine (n=245)	*	*	*	*
Linfonodi (n=200) (mandibolari, polmonari, inguinali)	*	*		*

Tabella 2: Indagini istopatologiche ed istochimiche effettuate sugli organi campionati.

5.3 Indagine sierologica

Dei 245 sieri prelevati, 139 sono risultati idonei per le indagini sierologiche. La presenza di anticorpi specifici anti-PRV è stata determinata utilizzando un test commerciale ELISA (CEDITEST PRV-gB, Cedi- Diagnostic B.V, Lelystad, Olanda), seguendo le istruzioni della casa. In ogni test nelle piastre veniva distribuito 100 µl di siero di riferimento PRV-1 nei pozzetti A1 e B1; 100 µl di siero di riferimento PRV-2 nei pozzetti C1 e D1; 100 µl di siero di riferimento PRV-3 nei pozzetti E1 e F1; e, nei pozzetti rimanenti i sieri da testare. Dopo aver agitato delicatamente, le piastre sono state incubate a 37°C per 1 ora. Dopo aver effettuato 6 lavaggi con 200 µl del buffer di lavaggio a pozzetto, nelle piastre sono stati

distribuiti 100 µl a pozzetto del coniugato diluito 1:30 con buffer di diluizione. Le piastre sono state nuovamente agitate ed incubate per un ora a 37°C. Dopo altri 6 lavaggi come riportato precedentemente, in ogni pozzetto sono stati distribuiti 100 µl di cromogeno. Le piastre sono state incubate per 20' a temperatura ambiente e successivamente la reazione è stata arrestata con 100 µl a pozzetto di stop solution. L'intensità della reazione è stata letta mediante uno spettrofotometro (Tirtek Multiskan Plus MK2, Made in Finland by Eflab a Joint Venture Company Lab System and Flow Laboratories), misurando la densità ottica dei pozzetti a 450 nm entro 15' e non oltre 60'. Le densità ottenute sono state calcolate utilizzando la seguente formula.

$$PI = 100 - [(OD_{450} \text{ test serum} / OD_{450} \text{ maximum}) \times 100]$$

Il test è stato considerato valido quando: il valore massimo di densità ottica (OD) non superava 1000; il valore della percentuale di inibizione del siero di riferimento 1 era >50%; il valore della percentuale di inibizione del siero di riferimento 2 era <50%; quando questi criteri non erano rispettati il test è stato considerato non valido. I campioni con una percentuale di inibizione (PI) < 50% sono stati considerati negativi, mentre con la PI > 50%.

5.4 Indagini di immunistochemica per PRV

Le sezioni montate con poli-L-lisina sono state sparaffinate in xilolo e reidratate in una serie decrescente di alcool. L'attività delle perossidasi endogene è stata bloccata incubando i vetrini per 5 minuti a 37°C in una soluzione di Endo/Blocker (Biomedica Corp. Foster City, CA, USA) diluita in metanolo (1:5). Dopo aver bloccato il legame non specifico degli anticorpi impiegati con un siero normale di cavallo, le sezioni sono state incubate, per 1 ora in stufa a una temperatura di 37° in camera umida, con l'anticorpo primario

[monoclonale di topo anti-PRV 1; (2 H6) diluito 1: 200 in tampone (TBS). Le sezioni sono state successivamente lavate con TBS ed incubate, per 20 minuti, con un siero normale di cavallo. A questo punto sono state nuovamente incubate per 10 minuti a temperatura ambiente con un anticorpo secondario Anti-Mouse/Anti-Rabbit/Anti-Goat IgG (Biotinylated Pan-Specific Vector Laboratories, inc Burlingame CA USA) e nuovamente sono state lavate con TBS per eliminare il secondario in eccesso. Successivamente è stato aggiunta una soluzione di streptavidina-perossidasi (Biospa, Milano, Italia) diluita 1:250 per 10 minuti e la reazione enzimatica è stata sviluppata utilizzando un substrato di aminoetilcarbazolo (AEC, Biømeda Corp) Le sezioni sono state infine controcolorate con ematossilina disidratata e montate in maniera permanente. In ogni esperimento è stato incluso un controllo positivo, costituito da una sezione di tonsilla di suino positiva. I controlli negativi sono stati effettuati utilizzando sezioni di tonsilla negativa, mediante l'omissione dell'anticorpo primario e sostituzione con un monoclonale di topo non relato.

5.5 Indagini di immunofluorescenza per PCV-2

La presenza di antigene virale 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).

È 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.

5.6 Indagini di immunoistochimica per PCV-2

Su una parte dei campioni di linfonodi risultati positivi per PCV-2 tramite le indagini di immunofluorescenza, sono state eseguite indagini immunoistochimiche per confermare la presenza di antigene virale di circovirus tipo 2. Le sezioni montate con poli-L-lisina sono state sparaffinate in xilolo e reidratate in una serie decrescente di alcool. L'attività delle perossidasi endogene è stata bloccata incubando i vetrini per 5 minuti a 37°C in una soluzione di Endo/Blocker (Biomedica Corp. Foster City, CA, USA) diluita in metanolo (1:5). Dopo aver bloccato il legame non specifico degli anticorpi impiegati con un siero normale di cavallo, le sezioni sono state incubate overnight a 4°C con anticorpo monoclonale specifico di origine murina (Mab F217) gentilmente fornito dal Dottor Gordon Allan (Veterinary Sciences Division, Department of Agriculture and Rural Development, Belfast, UK). Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario le sezioni sono state accuratamente e ripetutamente lavate con TBS. Le sezioni sono state poi incubate per 10 minuti a temperatura ambiente con un anticorpo secondario Anti-Mouse/Anti-Rabbit/Anti-Goat IgG (Biotinylated Pan-Specific Vector Laboratories, inc Burlingame CA USA) e nuovamente sono state lavate con TBS per eliminare il secondario in eccesso. Successivamente è stata aggiunta una soluzione di streptavidina-perossidasi (Biospa, Milano, Italia) diluita 1:250 per 10 minuti e la reazione enzimatica è stata sviluppata utilizzando un substrato di aminoetilcarbrazolo (AEC, Biomedica Corp) Le sezioni sono state infine controcolorate con ematossilina, disidratate e montate in maniera permanente. In ogni esperimento è stato incluso un controllo positivo che consisteva, come per le indagini di immunofluorescenza in sezioni di rene suino naturalmente infetto con PCV-2.

5.7 Indagine di biologia molecolare

Settanta campioni di tonsille positive all' immunistochemica sono state scongelate per effettuare indagini di biologia molecolare. Un grammo di tessuto è stato omogeneizzato in PBS. Dopo avere sminuzzato il tessuto con forbici questo è stato spostato in una provetta sterile con PBS e dopo una veloce centrifugazione è stato raccolto ed eliminato il PBS. Questa operazione è stata ripetuta per 5-6 volte fino a raggiungere una trasparenza sufficiente del PBS. Con una pipetta pasteur monouso è stato quindi eliminato il PBS ed i frammenti di tessuto sono stati trasferiti in una provetta eppendorf da 1,5 ml sterile ed RNAase-free . A questo punto è stato aggiunto ad ogni campione 1 ml di digestion buffer (tabella 3) e questi sono stati lasciati in digestione per 18h a 50° C in bagnomaria.

Componenti	Concentrazione Stock	Concentrazione finale	Volume per tessuto
Tris.Hcl pH 8	1M	50mM	50 µl
EDTA	0,5M	50mM	100 µl
SDS	10%	0,5%	50 µl
Proteinasi K	19 mg/ml	100 µg/ml	5,2 µl

Tabella 3: Composizione del digestion buffer utilizzato per l'estrazione

Una volta terminata la digestione le provette sono state centrifugate per 5' a 1000 rpm in microcentrifuga. Dopo questa operazione sono state prelevate aliquote di 100 µl prontamente poste nel termociclizzatore per 10' a 95 °C per denaturare la proteinasi K.

La nested PCR per l'amplificazione del DNA virale è stata effettuata utilizzando metodica e primer descritti da Ruiz-Fons et al. che è consistita in due amplificazioni partendo da 50 µl di campione digerito. Il bersaglio della nostra amplificazione è stato il gene gB che codifica per l'omonima proteina dell'envelope virale. Tale gene è stato scelto come bersaglio della PCR perché altamente conservato in tutti gli stipti virali di PRV. I primers utilizzati sono stati i seguenti

Fwd 1 : 5'-ATGGCCATCTCGCGGTGC-3'

Rev 1 : 5'- ACTCGCGGTCCTCCAGCA-3'

Fwd 2 : 5'- ACGGCACGGGCGTGATC-3'

Rev 2: 5'- GGTTTCAGGGTACCCCGC-3'

Dopo la prima amplificazione, che consisteva di 20 cicli a 95° C di 1' per la denaturazione, 60°C di 45" per l'annealing e 72°C di 30" per l'allungamento, il prodotto atteso consisteva in un frammento di 334bp. Per quanto riguarda invece la seconda amplificazione ci attendevamo un prodotto di 196bp risultante da 30 cicli a 95° C di 1' per la denaturazione, 60°C di 45" per l'annealing e 72°C di 30" per l'allungamento. I primers sopra descritti sono stati utilizzati ad una concentrazione di 0,2 µM i dNTPs e ad una concentrazione di 200 µM utilizzando 1 U di Taq polimerasi (Taq DNA polymerase, Sigma, Saint-Louis, Missouri) per reazione.

6 ANALISI STATISTICHE

Le differenze fra i gruppi sono state determinate impiegando il test del Chi-quadro.

7 RISULTATI.

7.1 Indagini istopatologiche condotte sui cinghiali

I risultati delle indagini istopatologiche condotte sui 245 cinghiali campionati sono presentati nelle tabelle seguenti.

Nel 38% (76/200) dei soggetti si rilevava una marcata iperplasia dei follicoli linfatici con la presenza di follicoli secondari (fig. a), nel 30% (60/200) dei casi e' stata osservata una deplezione follicolare (fig. b) e nel 35% (70/200) eosinofilia.

Linfonodi n= 200	
Iperplasia	76 (38%)
Deplezione	60 (30%)
Eosinofilia	70 (35 %)

Tabella 1: Principali lesioni rilevate nel campione di linfonodi analizzati.

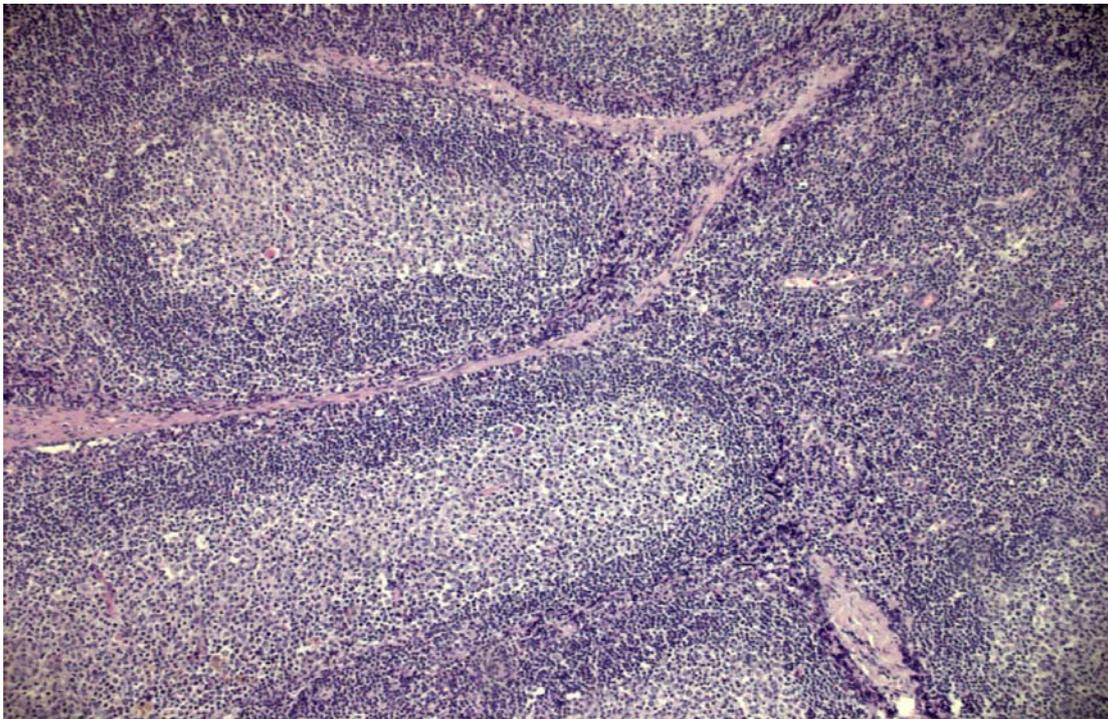


Figura a: Linfonodo. Iperplasia follicolare. E-E; Ob 20x.

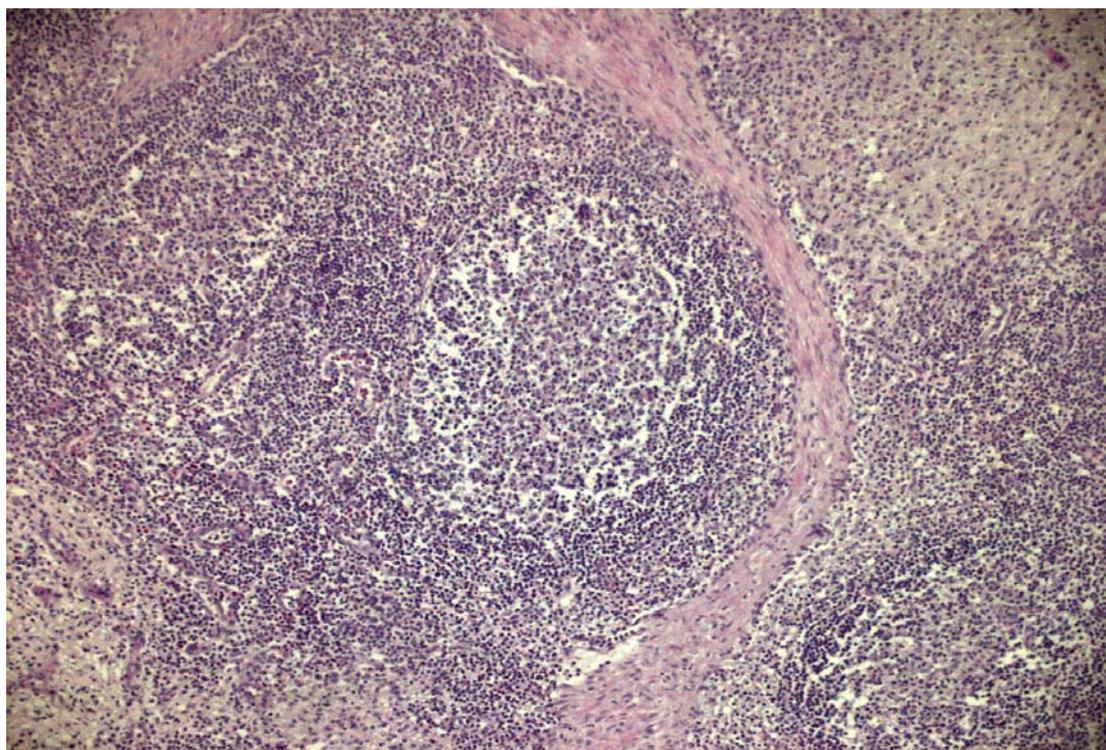


Figura b: Linfonodo. Deplezione centrollicolare. E-E; Ob 20x.

In 206 casi sui 245 esaminati sono state osservate forme di tonsillite necrotica (fig. c), nel 42% (103/245) dei casi lieve, nel 35% (86/245) moderata e nel 7% (17/245) grave. Il 9% (22/245) dei soggetti presentava tonsillite di origine batterica come testimoniato dalla presenza degli agenti eziologici nel citoplasma delle cellule fagocitarie. Nel 2% dei casi (5/245) è stato possibile rilevare nel contesto dei tessuti la presenza di granulomi specifici ad eziologia actinobacillare.

Tonsille n= 245	
Tonsillite necrotica +1	103 (42%)
Tonsillite necrotica +2	86 (35%)
Tonsillite necrotica +3	17 (7%)
Tonsillite batterica	22 (9%)
Tonsillite actinobacillare	5(2%)

Tabella 2: Principali lesioni rilevate nel campione di tonsille analizzate

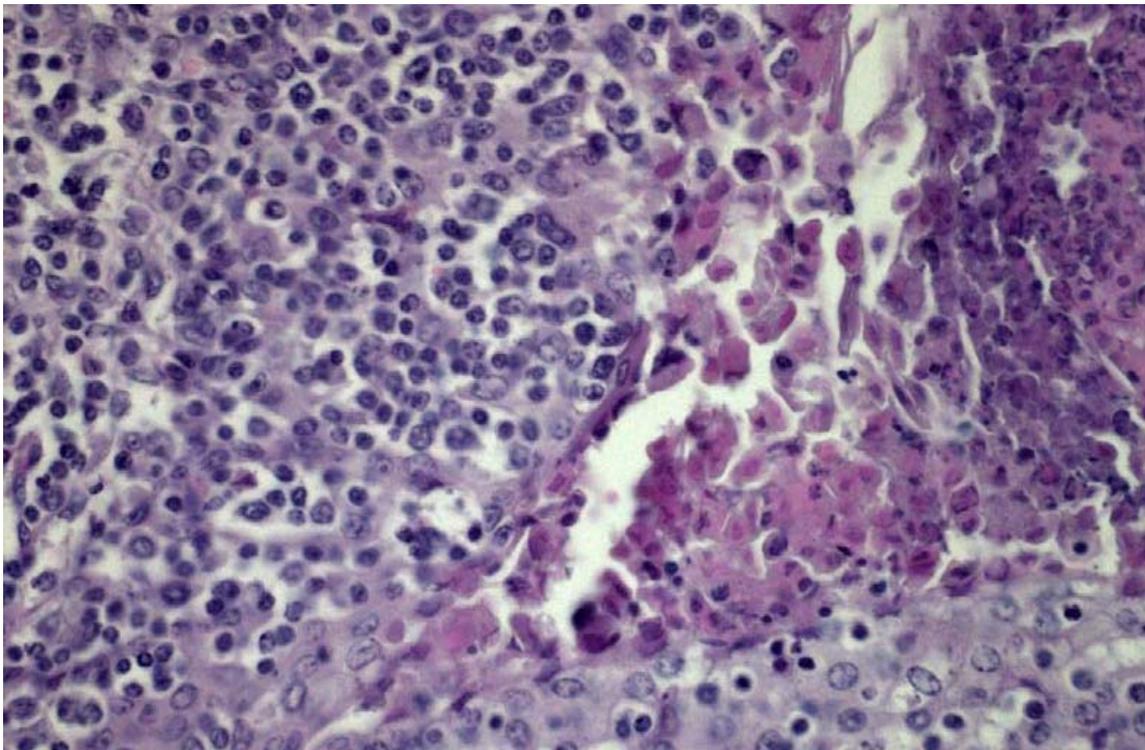


Figura c: Tonsilla palatina. Tonsillite necrotica. Sono presenti ampie aree di necrosi ed un denso infiltrato infiammatorio che si dispone intorno a queste. E-E; Ob 40x.

Molto rare infine sono state le lesioni caratteristiche di infezione da PCV-2. Nel suino infatti tale infezione è associata nella maggioranza dei casi a linfadeniti granulomatose con presenza di abbondanti cellule epitelioidee o giganti centrollicolari che mostrano frequentemente corpi inclusi virali citoplasmatici. Tale lesione è stata invece rilevata in pochi soggetti tra i cinghiali sottoposti ad esame, dove la presenza di cellule giganti è stata attestata solo nel 3% (6/200) dei soggetti (fig. d).

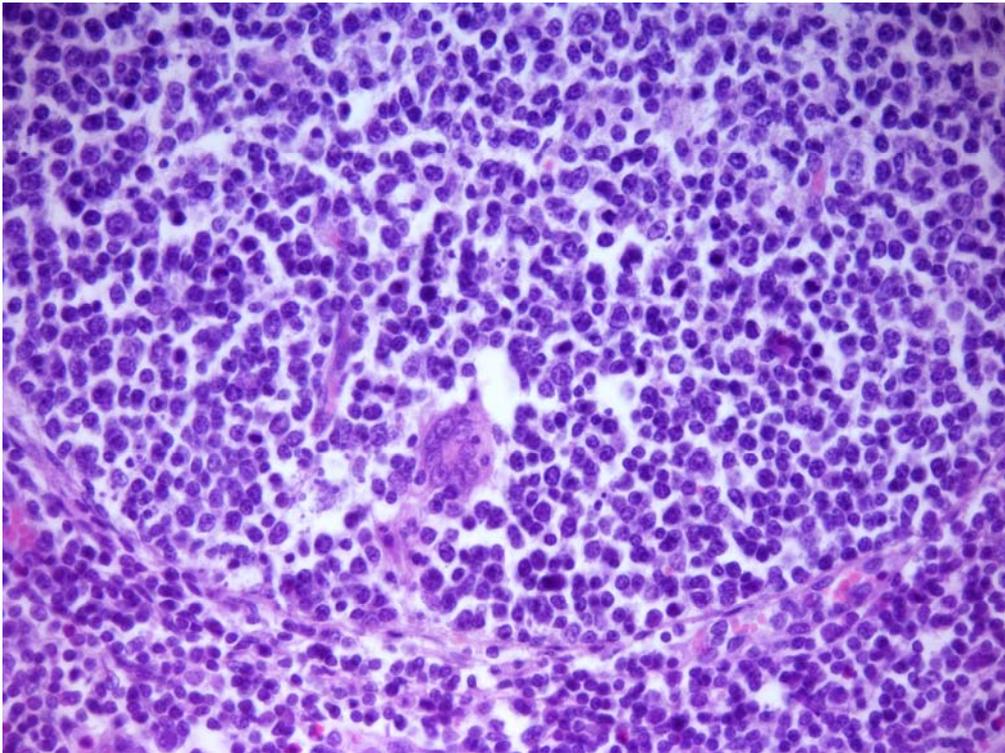


Figura d: Linfonodo inguinale superficiale. Iperplasia follicolare a cellule giganti. Al centro dell'immagine è presente una cellula fagocitaria multinucleata. E-E; Ob 40x.

7.2 Indagini sierologiche per PRV

Il 50,3% dei soggetti esaminati è risultato sierologicamente positivo per PRV. Soltanto il 22,2% (10/45) degli animali con età inferiore ad un anno sono risultati sieropositivi, mentre la sieropositività saliva al 65,9% (62/94) nei soggetti di età superiore.

I dati relativi alla sieropositività dei soggetti suddivisi sulla base del sesso sono riportati nella tabella 3.

	Positivi	Negativi
Sieri (n=139)	70 (50,3%)	69(49,7%)
≤ 1 anno (n=45)	10 (22,2%)	35(77,8%)
> 1 anno (n=94)	62 (65,9%)	32 (34,1%)
Maschi (n= 77)	41 (53,2%)	36 (46,8%)
Femmine (n=62)	29 (46,7%)	33 (53,3%)

Tabella 3. Risultati delle indagini sierologiche disaggregate sulla base dell'età e del sesso dei soggetti analizzati.

Nessuna differenza significativa è stata osservata tra la sieropositività delle femmine (62/139; 46,7%) e dei maschi (77/139; 53,2%).

7.3 Indagini immunoistochimiche per PRV

L'anticorpo monoclonale utilizzato ha consentito di rilevare una intensa colorazione specifica positiva nelle cellule della cripta tonsillare (fig. e) ed in cellule macrofagiche e linfoidi dei follicoli tonsillari (fig. f), sia nelle tonsille di controllo che in quelle di una parte dei cinghiali esaminati. In alcuni casi anche cellule linfoidi presenti nei grossi vasi presentano nel citoplasma una colorazione specifica. Le indagini hanno consentito di evidenziare una elevata positività nel tessuto tonsillare, mentre quasi del tutto assenti sono state le positività rilevate nei linfonodi. Gli unici linfonodi che hanno mostrato deboli positività sono stati quelli sottomandibolari a testimonianza della presenza di antigene virale in tessuti della cavità orale. Per tale motivo le indagini di immunoistochimica sono state concentrate sul tessuto tonsillare.

I risultati relativi alle indagini effettuate sulle tonsille e divise in base al sesso ed all'età dei soggetti sono presentati in tabella 4.

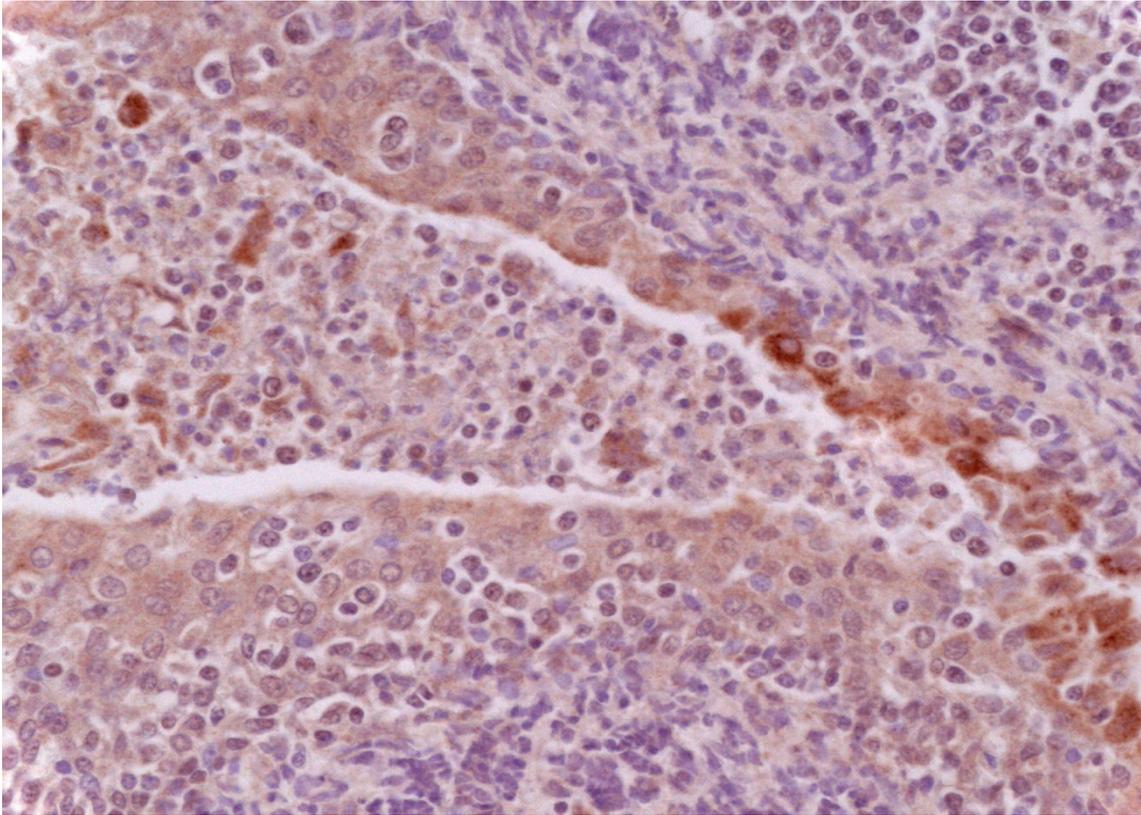


Figura e: Tonsilla palatina. Positivita' citoplasmatica per PRV in cellule della cripta tonsillare. IIC; Ob 40x.

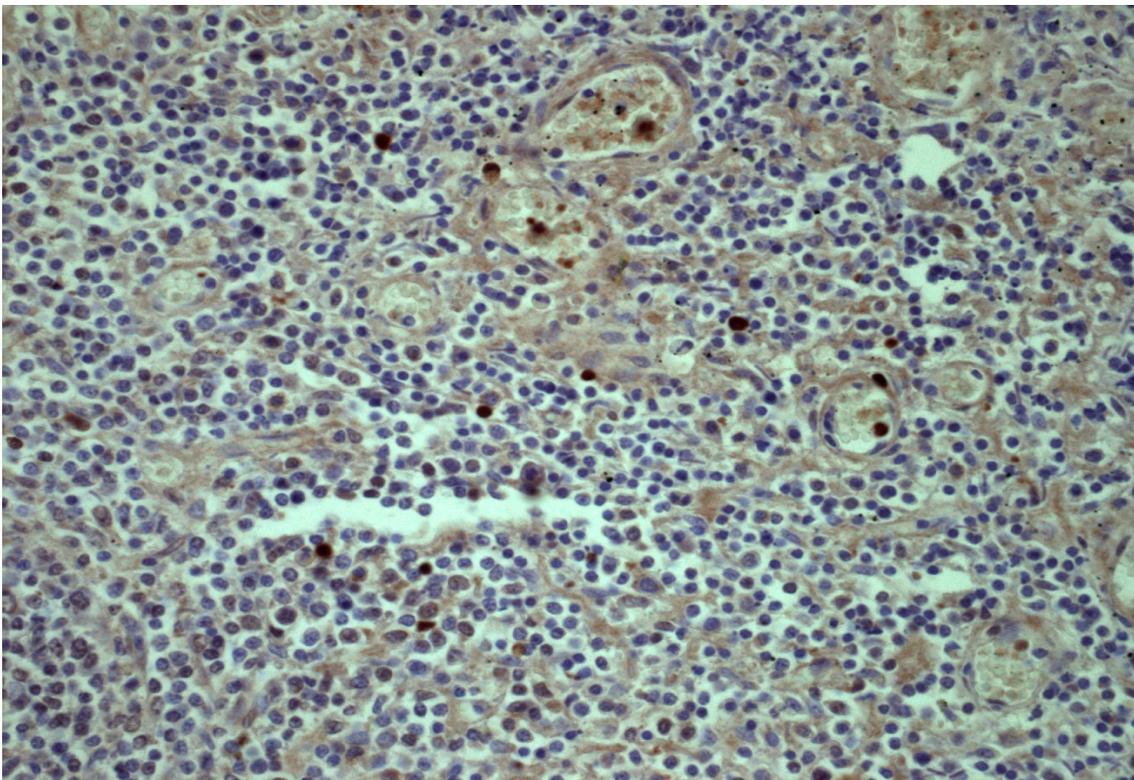


Figura f: Tonsilla palatina. Positivita' citoplasmatica per PRV in cellule linfoidi e macrofagiche. IIC; Ob 40x

	Positivi	Negativi
Tonsille (n=245)	95 (38,8%)	150 (61,2%)
≤ 1 anno (n=85)	15 (17,6%)	70 (82,4%)
> 1 anno (n=160)	92 (57,5%)	68 (42,5%)
Maschi (n=111)	44(39,6%)	67 (60,4%)
Femmine (n=134)	47 (35,1%)	87 (64,9%)

Tabella 4. Risultati delle indagini immunostochimiche disaggregate sulla base dell'età e del sesso dei soggetti analizzati.

Soltanto il 17,6% (15/85) dei soggetti con età inferiore ad un anno sono risultati positivi alle indagini di immunostochimica mentre nei soggetti di età superiore all'anno la positività è salita al 57,5% (92/160).

Nessuna differenza significativa è stata osservata tra le % di positività rilevate nelle femmine (47/134; 35,1%) e nei maschi (44/111; 39,6%).

7.4 Indagine di biologia molecolare

La nested PCR effettuata sui 70 campioni di tonsille di cinghiale, già positive all'immunostochimica, ha dimostrato (fig. g) una positività del 60% (42/70) .

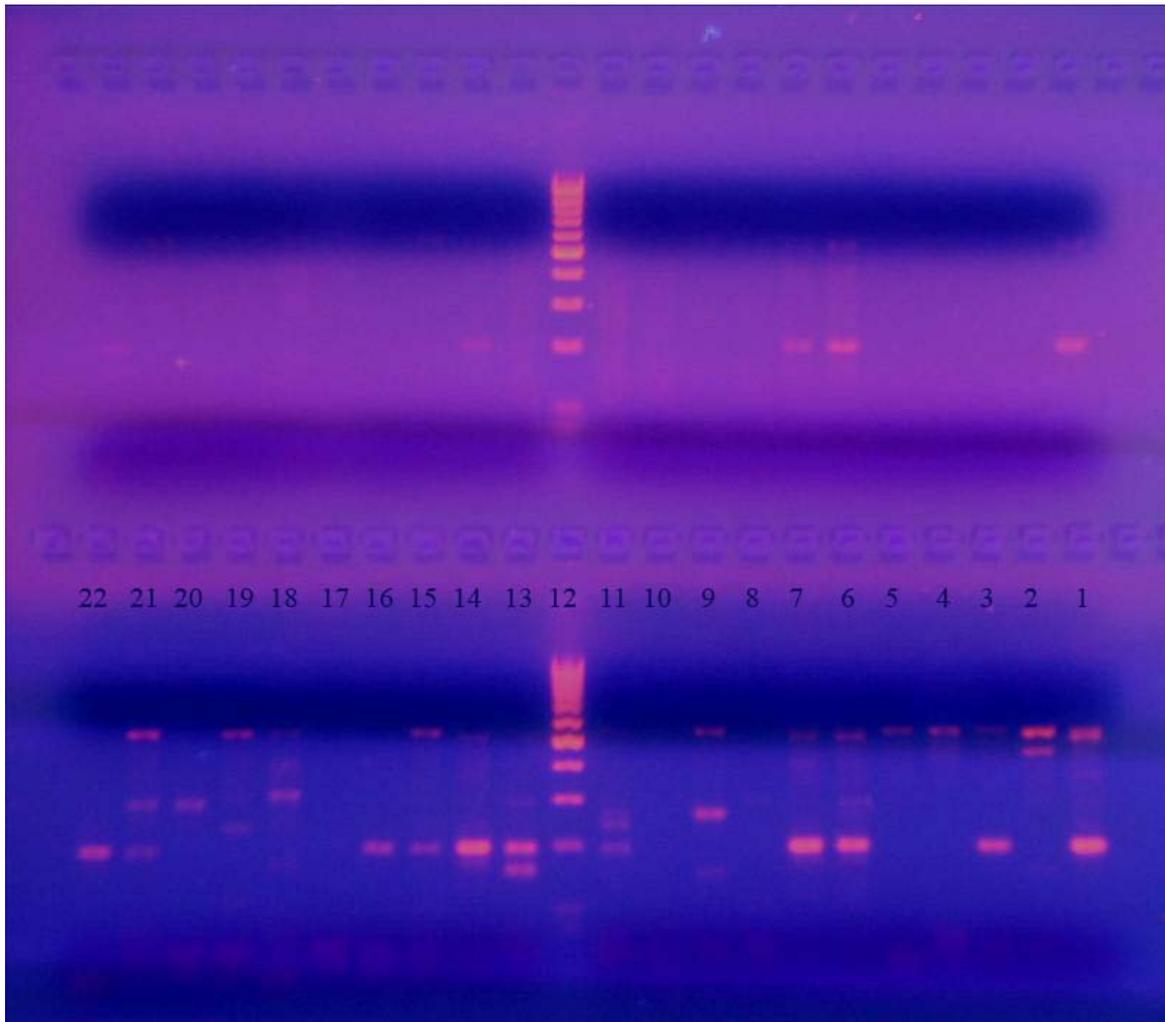


Fig. g: Elettroforesi su gel di agarosio della nested PCR per PRV: In alto la prima PCR e sotto la seconda amplificazione. Da destra verso sinistra; Pozzetto 1: controllo positivo. Pozzetti 3, 6, 7, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 22: reazioni positive. Pozzetti 2, 4, 5, 8, 9, 10, 17, 18, 19, 20, negativi. Pozzetto 12: marker di peso molecolare.

7.5 Indagini di immunofluorescenza e di immunoistochimica per PCV-2

L'anticorpo policlonale fluoresceinato utilizzato, sebbene ideato per colture cellulari, ha dimostrato di essere utilizzabile, con buoni risultati anche su tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Tale versatilità ha consentito di rilevare una intensa colorazione specifica positiva nel citoplasma delle cellule fagocitarie dei linfonodi sottoposti ad esame (fig h, i).

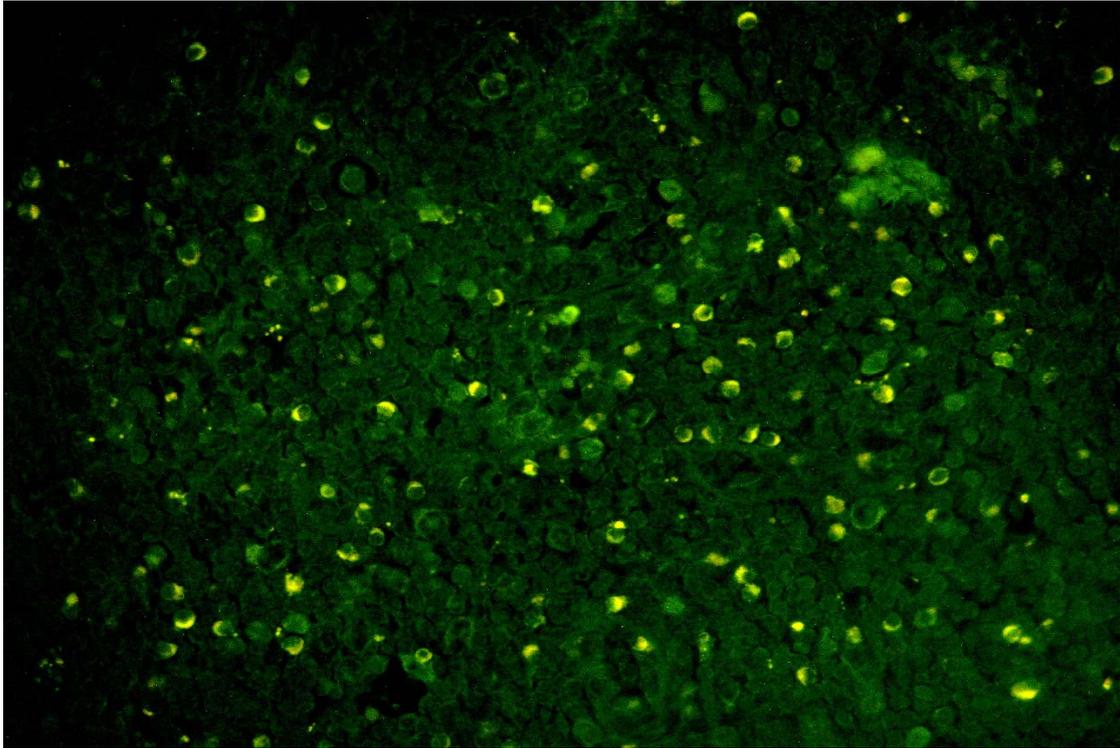


Figura h: linfonodo inguinale superficiale. Positività citoplasmatica per PCV-2 in cellule fagocitarie. IF; Ob 20x.

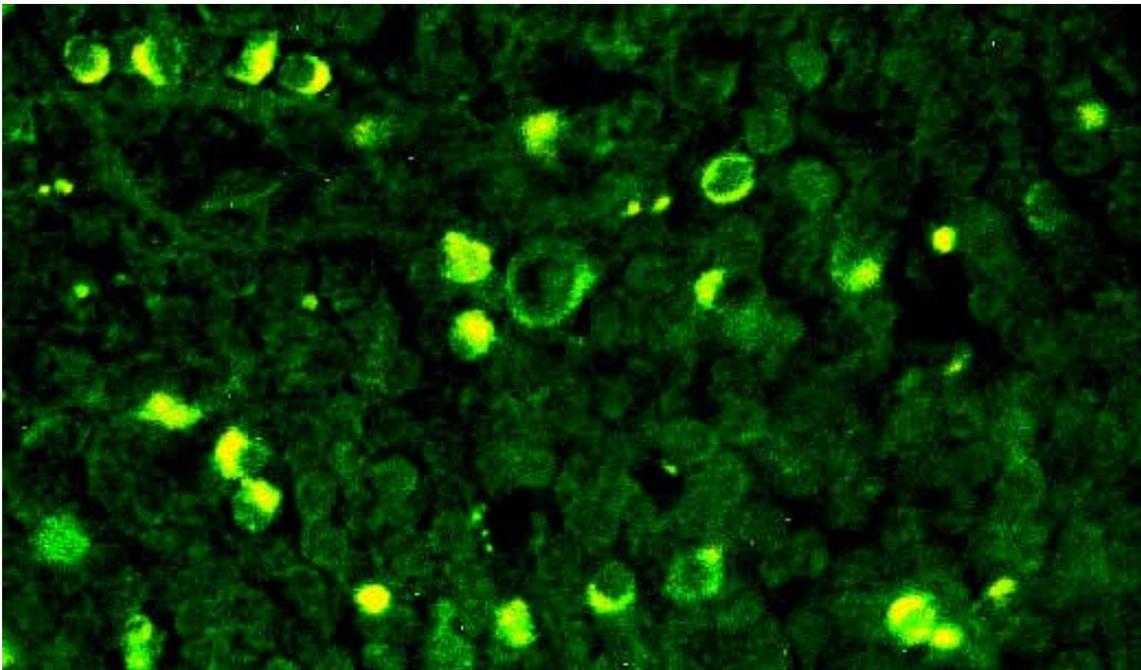


Figura i: linfonodo inguinale superficiale. Positività citoplasmatica per PCV-2 in cellule fagocitarie. Al centro è possibile notare un macrofago carico di antigene virale nel citoplasma. IF; Ob 100x.

I risultati delle indagini di immunofluorescenza effettuate sul campione di 200 linfonodi sono presentati nella tabella 5.

	Positivi	Negativi
Linfonodi (n=200)	27 (13,5%)	173 (86,5%)
≤ 1 anno (n=72)	9 (12,5%)	63 (87,5 %)
> 1 anno (n=128)	13 (10%)	115 (90%)
Maschi (n=94)	8 (8,5%)	86 (91,5%)
Femmine (n=106)	16 (15%)	90 (85%)

Tabella 5. Risultati delle indagini di immunofluorescenza disaggregate sulla base dell'età e del sesso dei soggetti analizzati.

Il 13,5% (27/200) dei linfonodi esaminati mostrava positività per l'antigene di PCV-2. Al contrario di quanto rilevato per il virus della pseudorabbia, non ci sono state correlazioni positive tra infezione virale ed età dei soggetti.

Nessuna correlazione è stata inoltre evidenziata nei gruppi divisi in base al sesso con valori di positività che si assestavano sull' 8,5% (8/94) per i maschi e sul 15% (16/106) per le femmine.

Per confermare le positività per PCV-2 rilevate con l'immunofluorescenza, su alcuni campioni di linfonodi positivi, sono state effettuate indagini di immunoistochimica. Gli anticorpi utilizzati (gentilmente forniti dal Dr. Gordon Allan in aliquote) hanno permesso di confermare le positività rilevate con gli anticorpi fluoresceinati. Un intensa colorazione specifica è stata messa in evidenza nel citoplasma e nel nucleo di cellule dendritiche centrollicolari (fig. l) mentre solo nel citoplasma di cellule istiocitarie interfollicolari ed incostantemente nel citoplasma delle cellule giganti multinucleate nei casi di linfadenite granulomatosa (fig. m).

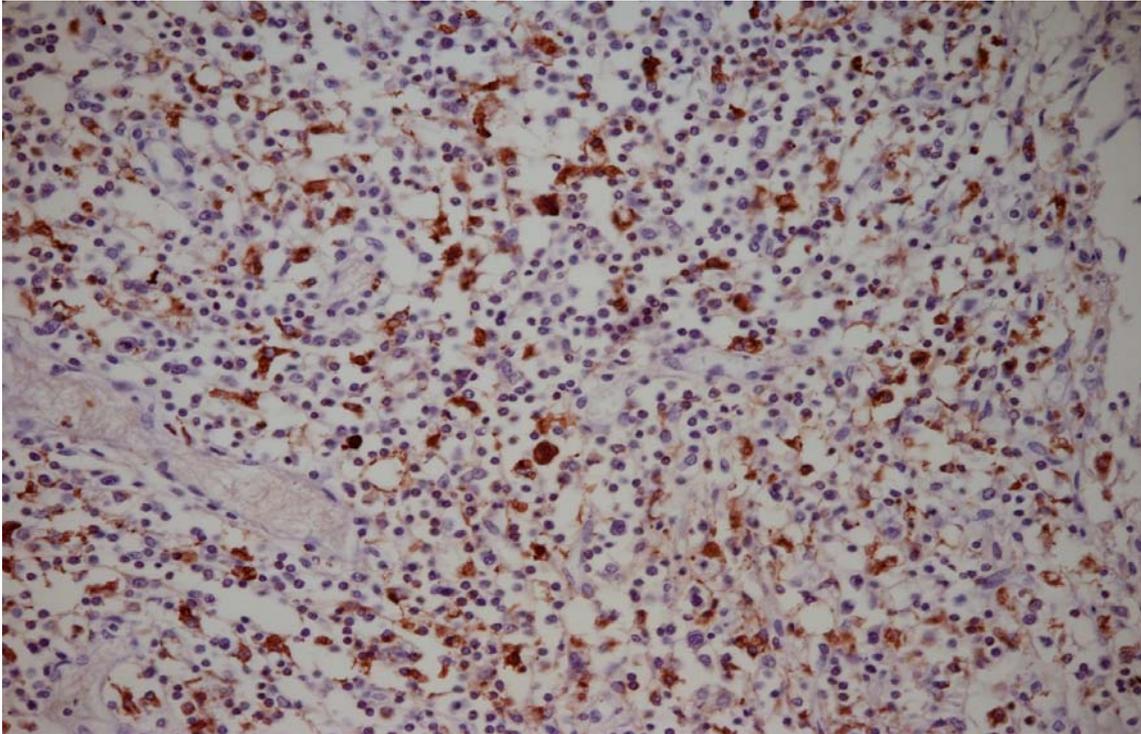


Fig I: Linfonodo inguinale superficiale. Intensa positività citoplasmatica e nucleare per PCV-2 in cellule dendritiche centrollicolari in un caso di deplezione. IIC; Ob 20x.

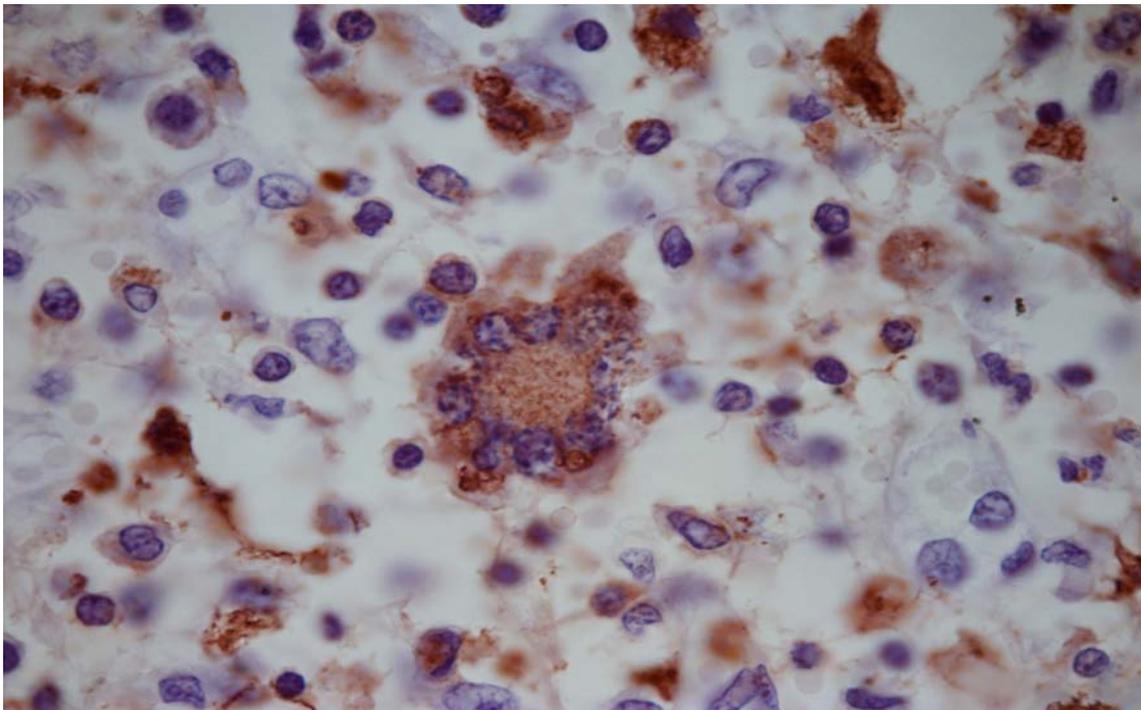


Fig m: Linfonodo inguinale superficiale. Intensa positività citoplasmatica per PCV-2 in una cellula gigante multinucleata in un caso di linfadenite granulomatosa. IIC; Ob 40x.

8 CONCLUSIONI.

I dati emersi dalle indagini sierologiche hanno evidenziato la presenza di un'elevata sieroprevalenza nella popolazione di cinghiali indagata e questo conferma l'ampia diffusione dell'infezione da PRV in quest'area (Guberti et al., 2002, Lari et al. 2006). In Italia, la sieroprevalenza dell'infezione da PRV nel cinghiale è variabile: in genere è contenuta tra il 20% ed il 30% (Oggiano et al., 1991; Cordioli et al., 1993), ma in alcune aree, come la Toscana, può essere superiore al 50%, come segnalato negli USA (Hahn et al., 1997). I monoclonali anti-PRV utilizzati hanno dimostrato di essere utili per svelare la presenza del virus, anche in sezioni incluse in paraffina. Questi risultati confermano il loro possibile impiego per la diagnosi della malattia di Aujeszky mediante la localizzazione dell'antigene (Grieco et al., 1997), così come le indagini di biologia molecolare hanno mostrato la loro utilità diagnostica nella specie selvatica se affiancati alle indagini sierologiche. La percentuale dei soggetti positivi è risultata più elevata negli animali adulti, dimostrando il carattere endemico dell'infezione nella popolazione in Toscana (Guberti et al., 2002, Lari et al. 2006), come in altre aree dell'Italia e di altri paesi Europei (Oggiano et al., 1991; Muller et al., 1998), mentre non sembra essere correlata con il sesso degli animali, come confermano recenti indagini effettuate nella Provincia di Grosseto (Lari et al., 2006). Il potere patogeno di PRV per il cinghiale non è attualmente conosciuto. In genere si ritiene che l'evoluzione della malattia sia subclinica e che questa decorra senza una sintomatologia apprezzabile (Tozzini et al., 1982). L'unico episodio di mortalità per infezione da PRV è stato segnalato in Spagna (Gortazar et al. 2002): la mortalità variava dal 14% nei giovani al 7,5% negli adulti. Probabilmente il comportamento di PRV nel cinghiale non differisce da quello che il virus presenta nel suino, sebbene i ceppi virali isolati dai suini selvatici siano attenuati se confrontati con quelli isolati dai domestici. Nonostante questa ridotta patogenicità non si può escludere che PRV possa comunque incidere sulla mortalità nella specie. I nostri risultati hanno evidenziato come una larga

parte dei soggetti esaminati presenti l'antigene virale nel tessuto tonsillare. Sebbene PRV dimostri una predilezione per il tessuto respiratorio e nervoso, il virus è stato isolato dalle tonsille diversi mesi dopo l'infezione ed il DNA virale è stato a sua volta rivelato, nella specie suina, mediante PCR, in questa sede dopo 12-16 settimane dall'inoculazione (Brown et al., 1995; Galeotta-Wheeler et al., 1991; Wittmann et al., 1983). In cinghiali infettati sperimentalmente PRV è stato isolato dalle tonsille di soggetti che avevano cessato di eliminare il virus per via orale, suggerendo uno stato di "carrier" di questi animali (Tozzini et al., 1982). Il risultato della nostra indagine evidenzia come nel cinghiale le tonsille possano essere infette per un lungo periodo con riflessi sulla diffusione del virus. I risultati delle indagini di biologia molecolare condotte con lo scopo di convalidare i dati ottenuti con la tecnica di immunistochemica hanno mostrato alcune differenze. Infatti solo il 60% dei campioni già testati positivi con l'immunistochemica ha dimostrato positività anche alla PCR. Tale discrepanza tra le due tecniche diagnostiche può essere spiegata con problemi di conservazione a carico dei tessuti congelati rispetto a quelli fissati in formalina e con il fatto che la presenza di antigene virale può non essere correlata a quella degli acidi nucleici per l'assenza dell'intero virione nelle cellule fagocitarie tonsillari. Infatti lo spiccato tropismo nervoso del virus e la possibilità di questo di potersi integrare con il genoma cellulare fanno sì che la presenza di antigeni dell'envelope ed acidi nucleici possa non coesistere.

Le indagini sulla trasmissione di PRV in questa specie selvatica indicano come il virus possa trasferirsi da un soggetto all'altro con meccanismi diversi. È stata dimostrata la trasmissione per via respiratoria, particolarmente nelle prime settimane dopo un'infezione acuta (Hahn et al., 1997) e quella per via sessuale. Quest'ultima è dimostrata dalla presenza del virus in tamponi genitali nel corso di infezioni sperimentali (Romero et al., 1997) e dalla dimostrazione che i gangli sacrali sono un frequente sito di latenza del virus nel cinghiale (Romero et al., 2003,). È stato inoltre ipotizzato che PRV possa essere

trasmesso, attraverso le carcasse di animali morti, ad altri cinghiali o a carnivori selvatici e domestici (Hahn et al., 1997). La nostra indagine conferma la diffusa presenza del virus nei tessuti dei soggetti infetti. Questo evidenzia come la presenza dell'infezione da PRV nella popolazione di cinghiali possa essere importante per le specie di carnivori selvatici a rischio di estinzione come il gatto selvatico (*Felis silvestris*), la lince (*Lynx lynx*), l'orso (*Ursus arctos*), ed in particolare il lupo (*Canis lupus*). A questo proposito è importante sottolineare come in alcune aree del nostro paese il cinghiale costituisca circa il 50% della dieta di questa specie (Meriggi et al., 1991). L' elevata positività della popolazione di cinghiali rilevata in Toscana, associata alla promiscuità che si può creare tra selvatico e suini allevati allo stato semibrado, lascia presupporre un aumento dell' incidenza della malattia nella popolazione suina con conseguenti perdite economiche in queste aziende.

I risultati della nostra indagine confermano come l'infezione da PRV sia endemica nella popolazione Toscana di cinghiali e per questo la specie selvatica deve essere considerata un importante "reservoir" per questo virus. L'esistenza di un'ampia popolazione di cinghiali potenzialmente infetti da PRV deve essere tenuta nella giusta considerazione nella programmazione e nell'attuazione dei programmi di eradicazione della malattia di Aujeszky dal suino. Per quanto riguarda invece l'infezione da PCV-2 nel cinghiale, le metodiche utilizzate per la diagnosi sono risultate utili e di possibile applicazione nella specie. I policlonali fluoresceinati utilizzati infatti, sebbene indicati per l'identificazione di PCV-2 in colture cellulari, hanno dimostrato una buona resa anche in tessuti inclusi in paraffina come confermato dalle indagini immunostochimiche.

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 della Toscana. Così com'è già stato dimostrato per il suino, i risultati confermano l'ipotesi di una presenza endemica del virus in questa specie. Nonostante le analisi effettuate sul campione disgregato in base all'età ed al sesso non sono state

messe in evidenza, al contrario dell'infezione da PRV, differenze significative per quanto riguarda la prevalenza nelle varie classi. Va comunque segnalato come tali risultati restino in linea con i precedenti studi condotti nel resto d'Europa con prevalenze tra il 10 e il 50% (*Vicente et al., 2004*). La presenza di antigene virale, rilevata in una bassa percentuale del campione ed unicamente sul tessuto linfonodale e non su quello tonsillare, esprime comunque un limitato coinvolgimento da parte dell'ospite. Questa conclusione è sostenuta anche dal fatto che le lesioni microscopiche caratteristiche, attribuibili all'azione patogena di PCV-2, si sono osservate in un ridotto numero di soggetti. Resta pertanto da approfondire le indagini sul il ruolo che il cinghiale può rivestire nell'epidemiologia della virosi.

6 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Albinia E. , Cabriolet R. , Eveno E et al. 1996. Premiers résultats du CNEVA sur le dépérissement fetal du porcelet en fin de post-sevrage. Suppl Sem Vet. 834 : 1-2.

Albinia E. , Mespedale A. , Chenut G. et al. 2000. 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. 77: 43-57.

Allan G.M. , Kennedy S. , McNeilly F. et al. 1999. Experimental reproduction of wasting disease and death by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. J of Comp Pathol. 121: 1-11.

Allan G.M. , Mackie D.P. , McNair J et al. 1994. Production preliminary characterization and application of monoclonal antibodies to porcine circovirus. Vet Immunol Immunopathol.; 43: 357-371.

Allan G.M. , Mcneilly F. , Cassidy J.P. et al. 1995. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrums deprived piglets and examination of pig foetal material. Vet Microbiol. 44: 49-64

Allan G.M. , McNeilly F. , Foster J.C. et al. 1994. Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. Vet Microbiol.; 41: 267-279. 85

Allan G.M. , McNeilly F. , Kennedy S. et al. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the United States of America and Europe. J Vet Diagn Invest. 10: 3-10.

- Allan G.M. , McNeilly F. , Meehan B.M. et al. 1999.** Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol.* 66: 115-123.
- Allan G.M. , Meehan B.M. , Todd D. et al. 1998.** Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec.* 142: 467-468.
- Allan G.M. , Phenix K.V. , Todd D. et al. 1994.** Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *J Vet Med B.* 41: 17-26
- Artois M. , Depner K.R. , Guberti V. , Hars J. , Rossi S. , Rutili D. 2002:** Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 21: 287-303.
- Balash M. , Segalès J. , Rosell C. et al. 1999.** Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol.* 121: 139-148.
- Ben-Porat T. , DeMarchi J.M. , Lomniczi. B. , Kaplan AS. 1986:** Role of glycoproteins of pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. *Virology.* 154: 325-334.
- Brown T.T. , Kwang K.O. , Fuller. F.J. 1995:** Detection of pseudorabies viral DNA in tonsillar epithelial cells of latently infected pigs. *Am. J. Vet. Res.* 56: 587-594.
- Buhk H.J. , Tisher I. , Koch M.A. 1985.** Cloning and sequencing of porcine circovirus (PCV) genome. *Zentralbe Bakteriell Org A.* 260: 465.
- Capua I. , Fico R. , Banks M. , Tamba M. , Calzetta G. 1997:** Isolation and characterization of an Aujeszky's disease virus naturally infecting a wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Microbiol.* 55: 141-6.

Capua I. , Casaccia C. , Calzetta G. , Caporale V. 1997: Characterisation of Aujeszky's disease viruses isolated from domestic animals and from a wild boar (*Sus scrofa*) in Italy between 1972 and 1995. *Vet. Microbiol.* 51: 143-149

Cheung A. , Vlicek C. , Paces V. , Schwyzer M. 1990: Update and comparison of the immediate-early gene DNA sequences of two pseudorabies virus isolates. *Virus Genes.* 4: 261-265.

Choi C. , Chae C. 2000. *In-situ* hybridization for the detection of porcine circoviruses with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol.* 121:265-70.

Churg J. , Sobin L.H. 1982. Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Diseases *IGAKU-SHOIN Ltd. Tokio-New York.*

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

Coe N.E. , Mengeling W. 1990: Mapping and characterization of neutralizing epitopes of glycoproteins gll1 and gp50 of the Indiana-Funkhauser strain of pseudorabies virus. *Arch. Viral.* 110: 137-142.

Cordioli P. , Callegari S. , Berlinzani A. , Foni E. , Candotti P. , Barigazzi G. 1993: Indagine sierologia su cinghiali dell'appennino Parmense. *Atti Soc. It. Sci. Vet.* 47: 1065-1068

Cotrell T.S. , Frienship R.M. , Dewey C.E. et al. 1999. Epidemiology of post-weaning multisystemic wasting syndrome in Ontario. *Proc Am Assoc Swine Pract.* 389-390.

Couser WG. 1993. Pathogenesis of glomerulonephritis *Kidney Int.* 44, Suppl. 42: S19-S26.

Daft B. , Nordhausen R.W. , Latimer K.S. et al. 1996. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six week-old pig. *Proc Am Assoc of Vet Lab Diagn.* 39: 32

Dahle J. , Patzelt T. , Schagemann G. , Liess B. 1993: Antibody prevalence of hog cholera , bovine viral diarrhoea and Aujeszky's disease virus in wild boars in northern Germany. *Dtsch. Tierarztl.Wochenschr.* 100: 300-3.

De Wind N. , Bems A. , Gielkens A. , Kimman T. 1993: Ribonucleotide reductase-deficient mutants of pseudorabies virus are avirulent for pigs and induce partial protective immunity. *J. Gen. Viral.*, 74:35 I-359.

Drolet R. , Thibault S. , D'Allaire S. , Thompson JR. 1999. Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS): an overview of the disease. *Sw Hlth & Prod.* 6: 283-285.

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

Edwards S. , Sands J. J. 1994. Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet Rec.* 134: 680-681. 87

Ellis J. , Bratanich A. , Clark E.G. et al. 2000. Co-infection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Dian Invest* 12.

Elbers A.R. , Dekkers L.J. , van der Giessen J.W. 2000: Sero-surveillance of wild boar in The Netherlands, 1996-1999. *Rev Sci Tech.*19: 848-54. **Ellis J. , Hassard L. , Clark E.G. et al. 1998.** Isolation of circovirus from lesions of pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J.* 39: 44-51.

Ellis J. , Krakowka S. , Allan G. et al. 1999. The clinical scope of PRRSV infection has expanded since 1987; an alternative explanation. *Vet Pathol.* 36: 262-265.

Ellis J. , Krakowka S. , Lairmore M. et al. 1999. Reproduction of lesions of post-weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest.* 11: 3-14.

Eloit M. , Bouzghaia H. , Toma B. 1990: Identification of antigenic sites on pseudorabies virus glycoprotein gp50 implicated in virus penetration of the host cell. *J. Gen. Virol.* 71: 2179-2183.

Fuchs W. , Rziha H-J. , Lukaes N. , Braunscheiger I. , Visser N. , Liitticken D. , Schreurs C S. , Thiel H-J. , Mettenleiter T.C. 1990: Pseudorabies virus glycoprotein g1: in vitro and in vivo analysis of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 71: 1141-1151.

Gaffuri A. , Tranquillo V.M. , Pellicoli L. , Lanfranchi P. 2002: Monitoraggio sanitario della fauna selvatica in provincia di Bergamo. *Rivista dell'OEVR (Osservatorio Epidemiologico IZS Brescia)* Anno 5 - n.5.

Galeota-Wheeler J. , Osorio F.A. 1991: Investigation of sites of pseudorabies virus latency, using polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1799-1803.

Gibbs M.J. , Weiller F. W. 1999. Evidence plant a virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. Proc Natl Acad Sci USA. 96: 8022-8027.

Giovannini A. , Cancellotti F.M. , Turilli C. , Randi E. 1988: Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy. J Wildl Dis. 1988. 24: 127-32.

Gortazar C. , Vincente J. , Fierro Y. , Leon L. , Cubero M.J. , Gonzales M. 2002: Natural Aujeszky's disease in a Spanish wild boar population. Ann N Y Acad Sci 969: 210-212.

Gresham A. , Jackson G. , Giles N. 2000. PMWS and porcine nephropathy syndrome in Great Britain. Vet Rec. 146: 143.

Grieco V. , Gelmetti D. Finazzi G. , Brocchi E. , Finazzi M. 1997: Immunohistologic diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease) using monoclonal antibodies. J. Vet. Diagn. Invest. 9: 326-8.

Guberti V. , Ferrari G. , Fenati M. , De Marco M.A. , Pasquali T. 2002: **Pseudorabies in wild boar.** Proceeding 4th Meeting European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians (EAZWV) 8-12 May, Heidelberg, Germany.

Hahn E.C. , Page G.R. , Hahn P.S. , Gillis K.D. , Romero C. , Anelli J.A. , Gibbs E.P.J. 1997: Mechanisms of transmission of Aujeszky's disease virus originating from feral swine in the USA. Vet. Microbiol. 55: 123-130.

Hamel A.L. , Lin L.L. , Nayar G.P.S. 1998. Nucleotide sequence of porcine circoviruses associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* . 72: 5262-5267.

Hanssens F. , Nauwynck H.J. , Pensaert M. 1993: Involvement of membrane-bound viral glycoproteins in adhesion of pseudorabies virus-infected cells. *J. Virol.* 67: 4492-4496.

Hardings J.C. 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc West Can Assoc Swine Pract.* 21. 88

Hardings J.C. , Clark E.G. , Strokappe J.H. et al. 1998. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod.* 6: 249-254.

Helie P. , Drolet R. , Germain M.C. 1995. Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. *Can Vet J.* 36: 150-154.

Hines R.K. , Lukert P.D. 1994. Porcine circovirus as a cause of congenital tremors in newborn pigs. *Proc Am Assoc Swine Pract.* 344-345.

Hinrichs U. , Ohlinger V.F. , Pesh S. et al. 1999. First report of porcine circovirus type-2 infection in Germany. *Tieraerztl Umsch.;* 54: 255-258.

Horner G.1991. Pig circovirus antibodies present in New Zealand pigs. *Surveil Wellington.* 18: 23.

http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/notifiable/disease/aujeszky_s.htm 1989; Aujeszky's disease in pigs – Notifiable Diseases (DEFRA, UK).

http://www.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_00039.htm, 2000: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines 4th edition.

<http://texnat.tamu.edu/symposia/feral/feral-12.htm> 1993: Davis Donald S. Feral hogs and disease: implications for humans and livestock.

Jacobs L. , Mulder W.A.M. , Van Oirschot J.T. , Gielkens A.L.J. , Kimman T.G. 1993: Deleting two amino acids in glycoprotein gI of pseudorabies virus decreases virulence and neurotropism for pigs, but does not affect immunogenicity. J. Gen. Viral. 74: 2201-2206.

Karger A. , Mettenleiter T.C. 1993: Glycoprotein gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus. Virol. 194: 654-664.

Kennedy S. , Allan G.M. , McNeilly F. et al.1998. Porcine circovirus infection in Northern Ireland . Vet Rec. 142: 495-496.

Kimman T.G. 1994: Inactivation of glycoprotein gE and thymidine kinase or the US3-encoded protein kinase synergistically decreases in vivo replication of pseudorabies virus and the induction of protective immunity. Viral. 205: 511-518.

Kimman T.G. , de Wind N. , Oei-Lie N. , Pal J.M.A. , Berm A.J.M. , Gielkens A.L.J. 1992: Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpes virus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity. J. Gen. Viral. 73: 243-251.

Kimman T.G. 1994: Immunological protection against pseudorabies virus. Proc. O.I.E. Symp. on Aujeszky's Disease, Bangkok, Thailand, pp. 11-22.

Kit S. , Kit M. , Pirtle CC. 1985: Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1359-1367.

Klupp B. , Baumeister J. , Karger A. , Visser N. , Mettenleiter T.C. 1994: Identification and characterization of a novel structural glycoprotein in pseudorabies virus, gL. *J. Virol.* 68: 3868-3878.

Klupp B. , Visser N. , Mettenleiter T.C. 1992: Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein H. *J. Virol.* 66: 3048-3055.

Krakowa S. , Ellis J.A. , McNeilly F. et al. 2001. 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.* 38: 31-42.

Kritas S.K. , Nauwynck H.J. , Pensaert M.B. 1995: Dissemination of wild-type and gC-, gE- and gI-deleted mutants of Aujeszky's disease virus in the maxillary nerve and trigeminal ganglion of pigs after intranasal inoculation. *J. Gen. Viral.* 76: 2063-2066.

Kritas S.K. , Pensaert M.B. , Mettenleiter T.C. 1994: Role of envelope glycoproteins gI, gp63 and gII1 in the invasion and spread of Aujeszky's disease virus in the olfactory nervous pathways of the pig. *J. Gen. Viral.* 75: 2319-2327.

Kritas S.K. , Pensaert M.B. , Mettenleiter T.C. 1994: Invasion and spread of single glycoprotein deleted mutants of Aujeszky's disease virus in the trigeminal nervous pathway of pigs after intranasal inoculation. *Vet. Microbial.* 40: 323-334.

Kuipel M. , Stevenson G.W. , Mittal S.K. , Clark E.G. 1998. Circovirus-like disease in weaned pigs in Indiana. *Vet Pathol.* 35: 303-307.

Laddomada A. 2000. Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Vet Microbiol.* 73 :121-130. 89

Lari A. , Lorenzi D. , Nigrelli D. , Brocchi E. , Faccini S. , Poli A. 2006. Pseudorabies virus in European wild boar from central Italy. *J Wildl Dis.* 42:319-24.

Larochelle R. , Morin M . , Antaya M. et al. 1999. Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR. *Vet Rec.* 145: 140-142.

LeCann P. , Albina E. , Madec F. 1997. Piglet wasting disease. *Vet Rec.* 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. 1999. Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina en la República Argentina: patología y detección de circovirus porcino 9° Enc Nac de Pat Vet (ENAPAVE).

Mankertz A. , Blaess G. , Mankertz J. et al. 1993. Analysis of transcription and replication of porcine circovirus PCV. *IXth Int Congr Virol.* 1939: 76.

Mankertz A. , Mankertz J. , Wolf K. et al. 1998. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol.* 79: 381-384.

Mankertz A. , Persson F. , Mankertz J. et al. 1997. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. J Virol. 71: 2562-2566.

Marchioli C.C., Yancey R.J., Timmins .J.G., Post L.E., Young B.R. and Povendo L.A. 1988: Protection of mice and swine from pseudorabies virus-specific mouse monoclonal antibodies. Am. J. Vet. Res. 49: 860-864.

Meriggi A., Rosa P., Brongi A., Matteucci C. 1991: Habitat use and diet of the wolf in Northern Italy. Acta Theriol. 36: 141-151.

McNeilly F. , Allan G.M. , Foster J.C. et al. 1996. Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function. Vet Immunol Immunopathol. 49: 295-306.

McNeilly F. , Kennedy S. , Moffett D. et al. 1999. 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. 80: 123-128.

Meehan B.M. , Creelan J.L. , McNulty M.S. , Todd D. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. J Gen Virol. 78: 221-227.

Meehan B.M. , McNeilly F. 1998. Todd D. et al. Characterization of novel circoviruses associated with wasting syndromes in pigs. *Gen Virol.* 79: 2171-2179.

Mettenleiter T.C. , Lomniczi B. , Zsak L. , Medveczky I. , Ben-Porat T. , Kaplan AS. 1989: J.T. Van Oirschot (Editor) Analysis of the factors that affect virulence of pseudorabies virus. Proc. CEC Seminar on Vaccination and Control of Aujeszky's Disease. pp. 3- 11.

Mettenleiter T.C. , Zsak L. , Zuckermann F. , Sugg N. , Kern H. , Ben-Porat T. 1990: Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus. J. Virol. 64: 278-286.

Miry C. , Pensaert M. 1989: Aujeszky's disease virus replication in tonsils and respiratory tract of non-immune and immune pigs. In: J.T. van Oirschot (Editor), Vaccination and Control of Aujeszky's Disease, pp. 163-173.

Mörner T. , Obendorf D.L. , Artois M. , Woodford M.H. 2002 : Surveillance and monitoring of wildlife T diseases. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 21: 67-76.

Morozov I. , Sirinaurumiter T. , Sorden S.D. et al. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. J Clin Microbiol. 36: 2535-2541.

Mulder W.A.M. , Pol J.M.A. , Kimman T.G. , Kok G.L. , Priem J. , Peeters B.P.H. 1995: gD-negative pseudorabies virus can spread transneuronally via direct cell-to-cell transmission in its natural host, Abstract No. 52. 20th bit. Herpesvirus Workshop, Groningen. The Netherlands.

Muller T. , Klupp B. , Zellmer R. , Teuffert J. , Ziedler K. , Possardt C. , Mewes L. , Dresenkamp B. , Conraths F.J. , Mettenleiter TC. 1998: Characterisation of pseudorabies virus isolated from wild boar (*Sus scrofa*). Vet Rec. 143: 337-40.

Muller T. , Teuffert J. , Ziedler K. , Possardt C. , Kramer M. , Staubach C. , Conraths FJ. 1998: Pseudorabies in the European wild boar from eastern Germany. *J. Wildlife Dis.* 34 : 251-258.

Nakamura T. , Ihara T. , Nagata T. , Ishihama A. , Ueda S. 1990: A complement-dependent neutralizing monoclonal antibody against glycoprotein II of pseudorabies virus. *Vet. Microbiol.* 24: 193-198.

Nauwynck H.J. , Pensaert M.B. 1992: Abortion induced by cell-associated pseudorabies virus in vaccinated sows. *Am. J. Vet. Res.* 53: 489-493.

Nauwynck H.J. , Pensaert M.B. 1995b: Effect of specific antibodies on the cell-associated spread of pseudorabies virus in monolayers of different cell types. *Arch. Virol.* 140: 1137- 1146.

Nauwynck H.J. 1993: The cell-associated spread of Aujeszky's disease virus and its possible role in the pathogenesis of abortion in vaccinated sows. Ph.D. thesis, Gent, Belgium.

Nayar G.P.S. , Hamel A. , Lin L. 1997. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can Vet .* 38: 385-386.

Niagro F.D. , Forsthoefel A.N. , Lawthr R.P. et al. 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes; intermediates between the geminivirus and plant circovirus. *Arch Virol.* 143: 1723-1744.

Oggiano A. , Patta C. , Laddomada A. , Caccia A. 1991: Indagine epidemiologica sulla diffusione della malattia di Aujeszky nei cinghiali della Sardegna. *Atti Soc. It. Sci. Vet. :* 1157-61.

Pallares F. , Halbur P.G. , Opriessnig T. et al. 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). J.Vet Diagnostic Investigation. 14: 515-519.

Peeters B. , De Wind N. , Broer R. , Gielkens A. and Moormann R. 1992: Glycoprotein H of pseudorabies is essential for entry and cell-to-cell spread of the virus. J. Virol. 66: 3888-3892.

Peeters B. , De Wind N. , Hooisma M. , Wagenaar F. , Gielkens A. , Moormann R. 1992: Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gl1 are essential for virus penetration, but only gl1 is involved in membrane fusion. J. Viral. 66: 894-905.

Pensaert M.B. , De Smet K. , De Waele K. 1990 : Extent and duration of virulent virus excretion upon challenge of pigs vaccinated with different glycoprotein-deleted Aujeszky's disease vaccines. Vet. Micro-biol. 22: 107-117.

Pol J.M.A. 1990: Interferons affect the morphogenesis and virulence of pseudorabies virus. Ph.D. thesis, Utrecht, The Netherlands.

Poli A. , Guarda F. , Mazzei M. et al. 2002. Osservazioni preliminari sulla prevalenza ed il tipo di glomerulonefriti nel suino. XXVIII Meeting annuale Soc. It. Pat. All. Suino.

Ramos-Vara J.A. , Duran O. , Render J.A. 1997. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in te USA. Vet Rec. 141: 479-480.

Rauh 1. , Mettenleiter T.C. 1991: Pseudorabies virus glycoprotein gl1 and gp50 are essential for virus penetration. J. Viral. 65: 5348-5356.

Rodrigue-Arroja G.M. , Segalès J. , Rossel C. et al. 1999. Aujeszky's disease virus infection concurrent with *postweaning multisystemic wasting syndrome* in pigs. *Vet Rec.* 144: 152-153.

Romero C.H. , Meade P.N. , Shultz J.E. , Chung H.Y. , Gibbs E.P. , Hahn E.C. , Lollis G. 2001: Venereal transmission of pseudorabies viruses indigenous to feral swine. *J. Wildl. Dis.* 37: 289-96.

Romero C.H. , Meade P.N. , Homer B.L. , Shultz J.E. , Lollis G. 2003: Potential sites of virus latency associated with indigenous pseudorabies viruses in feral swine. *J. Wildlife Dis.* 39: 567-575.

Romero C.H. , Meade P.N. , Santagata J. , Gillis K. , Lollis G. , Hahn E.C. , Gibbs E.P.J. 1997: Genital infection and transmission of pseudorabies virus in feral swine in Florida, USA. *Vet. Microbiol.* 55: 131-139.

Ros Bascuñana C. , Björnerot L. , Ballagi-Pordány A. , Robertsson J-Å. , Belák S. 1997: Detection of pseudorabies virus genomic sequences in apparently uninfected "single reactor" pigs. *Veterinary Microbiology.* 55: 37-47.

Rossel C. , Segalès J. , Plana-Duran J. et al. 1999. Pathological, immunohistochemical and *in-situ* hybridization studies of natural cases of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol.* 120: 59-78.

Ruiz-Fons F. , Vidal D. , Hofle U. , Vicente J. , Gortazar C. 2007. Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild boar. *Vet Microbiol.* 120:241-50.

Sabo A. , Rajcani J. , Blaskovic D. 1968: Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease virus. I. Distribution of the virulent virus in piglets after peroral infection. *Acta Viral.*, 12: 214-221.

Sabo A. , Rajcani I. , Blaskovic D. 1969: Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease virus. III. The distribution of virulent virus in piglets after intranasal infection. *Acta Virol.* 13: 407-414.

Sambrook J. , Fritsch E.F. , Maniatis T. 1989: Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sanchez R. , Nauwynck H. , Pensaert M. 2001. Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig population in Belgium. *Proceedings of the European Society for Veterinary Virology.*

Sarli G. , Panarese S. , Mandrioli L. et al. 2003. Caratterizzazione istopatologica della nefrite in corso di PMWS del suino. V Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. 146-147.

Sarli. G. , Ostanello F. , Moranti F., Nigrelli A. et al. 2007. Applicazione di un protocollo per la diagnosi di PMWS. XXXIII Meeting annuale Soc. It. Pat. All. Suino.

Schreurs C. , Mettenleiter T.C. , Zuckermann F. , Sugg N. and Ben-Porat T. 1988: Glycoprotein gII1 of pseudorabies virus is multifunctional. *J. Virol.* 62: 2251-2257.

Schulze C. , Segalés J. , Neumann G. et al. 2004. Identification of postweaning multisystemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Rec.* 154: 694-696.

- Segalés J. , Piella J. , Marco E. 1998.** Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Vet Rec.* 142: 483-486.
- Segalés J. , Marco I. , Calsamiglia M. 2002.** Evidence of porcine circovirus type 2 infection in wild boar (*Sus scrofa*) in Spain. Congress Ames, Iowa USA.
- Segalés J. , Piella j. , Marco E. et al. 1996.** Clinicopathological findings related the first description in Spain of Porcine dermatitis/ nephropathy syndrome. Proc of the 14th IPVS Congress. 709.
- Segalés J. , Sitjar M. , Domingo M. et al. 1997.** First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec.* 141: 600-601.
- Sierra M.A. , De Las Mulas J.M. 1997.** Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis (PIGD) syndrome. *Eur J Vet Pathol.* 3: 63-70.
- Smith W.J. , Thompson J.R. , Done S. 1993.** Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec.* 132: 47.
- Solignac T. 1997.** Syndrome dermatite-néphropathie. Quelques observations Cliniques chez le porcelet. *Sem Vét Suppl.* (I-II).
- Sorden S.D. , Arms P.A. , Sirunarumitir T. et al. 1998.** 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.* 41: 75.
- Spillane P. , Kennedy S. , Meehan B. , et al. 1998.** Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Vet Rec.* 143: 511-512.

Thedford T.R. , Wright J.C. 1980: Pseudorabies. Oklahoma Cooperative Extension Service, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma State University. F-9108.

Thibault S. , Drolet R. , Germain M.C. 1998. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol.* 35: 108.

Thompson J.R. , Lainson F.A. 1998. A study of *Pasteurella Multocida* as a possible aetiological agent in porcine immune complex glomerulonephritis and dermatitis syndrome. Proceedings of the 15th IPVS Congress. 3: 396.

Tischer I. , Buhk H.J. 1998. Viral DNA from cells infected with porcine circovirus. *Zent Baktiol Org A.* 270: 280-287.

Tischer I. , Gelderblom H. , Vettermann W. et al. 1982. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. *Nature.* 295: 64-66.

Tischer I. , Geldglom H. , Vettermann W. et al. 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine population of different breeding farms. *Arch Virol.* 140: 737-743.

Tischer I. , Miels W. , Wolff D. et al . 1986. Studies on the pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol.* 91: 271-276.

Tischer I. , Peters D. , Pociuli S. 1995. Occurrence and role of an early antigen and evidence for transforming ability of porcine circovirus. *Arch Virol.* 140: 1799-1816.

Tischer I. , Peters D. , Rasch R. et al. 1987. Replication of porcine circovirus-induction by glucosamine and cell-cycle dependence. *Arch Virol.* 96: 39-57.

- Tischer I. , Rasch R. , Tochtermann G. 1974.** Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. Zentralbe Bakteriolog Org A. 226: 153-167.
- Todd D. , Creelan J.L. , Meehan B.M. et al. 1996.** Investigation of transfection capability of cloned tandemly-repeated chicken anemia virus DNA fragments. Arch Virol. 141: 1523-1534.
- Tozzini F. , Poli A. , Della Croce G. 1982:** Experimental infection of european wild swine (*Sus scrofa*) with pseudorabies virus. J. Wildlife Dis. 18: 425-428.
- Van Haleren A. , Bakker S. , Wessels J.C. 1995.** Dermatitis/nephropathy syndrome in pigs Tydskrift van die Suid Afrikaanse Veteriner Mediese Verenging. 66(3): 108-110
- Vannier P. , Hutet E. , Bourgueil E. , Cariolet R. 1990:** Vaccins contre la maladie d'Aujeszky et souches vaccinales delttees. Rec. Med. Vet. 166: 1127-1133.
- Vicente J. , Leon-Vizcaino L. , Gortaz C. et al. 2002.** Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from south-central Spain. J.Wildl.Dis. 38: 649-652.
- Wathen L.M.K. , Platt K.B. , Wathen M.W. , van Deusen R.A. , Whetstone C.A. , Pirtle E.C. 1985:** Production and characterization of monoclonal antibodies directed against pseudorabies virus. Virus Res. 19-29.
- Wittmann G. , Jakubik J. , Ahl R. 1980:** Multiplication and distribution of Aujeszky's disease (pseudo-rabies) virus in vaccinated and non-vaccinated pigs after intranasal infection. Arch. Virol. 66: 227-240.

Wittmann G. , Ohlinger V. , Rziha H.J. 1983: Occurrence and reactivation of latent Aujeszky's disease virus following challenge in previously vaccinated pigs. Arch Virol. 75: 29-41.

Workman J. , Abmayr S. , Cromlish W. , Roeder. R. 1988: Transcriptional regulation by the immediate-early protein of pseudorabies virus during in vitro nucleosome assembly. Cell. 55: 211-219.

Zhang G. , Stevens R. , Leader D.P. 1990: The protein kinase encoded in the short unique region of pseudorabies virus: Description of the gene and identification of its product in virions and in infected cells. J. Gen. Virol. 71: 1757-1765.

Zsak L. , Zuckermann F. , Sugg N. , Ben-Porat T. 1992: Glycoprotein g1 of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. J. Virol. 66: 2316-2325.

Zsak L. , Mettenleiter T.C. , Sugg N. , Ben-Porat T. 1989: Release of pseudorabies virus from infected cells is controlled by several viral functions and is modulated by cellular components. J. Virol. 63: 5475-5477.

Zuckerman F.A. , Zsak L. , Mettenleiter T.C. , Ben-Porat T. 1990: Pseudorabies virus glycoprotein g11 is a major target for murine and swine virus-specific cytotoxic T-lymphocytes. J. Virol. 64: 802-812.