

PREVALENZA E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI PCV2 IN CINGHIALI ABBATTUTI IN PROVINCIA DI REGGIO EMILIA

PCV2 OCCURENCE AND GENETIC CHARACTERISATION IN HUNTED WILD BOARS IN REGGIO EMILIA PROVINCE

MAIOLI G.¹, CORRADINI C.², BONILAURI P.¹, DOTTORI M.¹, CANELLI E.¹,
CANTONI A.M.³, FONTANA R.¹, LUPPI A.¹

1-Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna

2- Veterinario Libero Professionista

3-Università degli Studi di Parma, Facoltà di Medicina Veterinaria

Parole chiave: Circovirus suino tipo 2 (PCV2), cinghiale, epidemiologia

Key words: Porcine circovirus 2 (PCV2), wild boar, epidemiology

Riassunto: Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è l'agente eziologico della sindrome multisistemica del deperimento post-svezzamento del suino (Post Weaning Multisystemic wasting syndrome, PMWS). In questo studio, è stata valutata, mediante PCR, la prevalenza dell'infezione da PCV2 in campioni di milza di cinghiali abbattuti nelle aree collinari e di montagna della provincia di Reggio Emilia.

L'indagine tramite Real Time PCR per PCV2, ha fornito risultati positivi in 3 animali su 70 campionati (4,3%), da cui è stato isolato il virus e caratterizzato geneticamente. Tutti i campioni positivi sono stati prelevati nel comune di Castelnovo ne' Monti in cui si osserva la più alta densità di allevamenti di suini. In seguito ad inoculazione su coltura cellulare il virus è stato isolato e successivamente genotipizzato come PCV2b, sporadico negli allevamenti di suini fino al 2004 e prevalente dopo questo periodo. Questo dato rafforza l'ipotesi di un possibile legame epidemiologico fra i cinghiali ed i suini domestici che vivono nello stesso territorio.

Futuri studi in questa direzione, associati ad indagini filogenetiche che permettano di valutare l'analogia tra ceppi virali circolanti nei suini domestici e quelli isolati nel cinghiale, saranno necessari per una migliore comprensione del ruolo che svolge il cinghiale nell'epidemiologia della malattia.

Abstract: Porcine circovirus 2 (PCV2) is the causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The present study evaluated the presence of PCV2 in wild boar hunted in hilly and mountain areas from Reggio Emilia province. PCV2 DNA was found in 3 of 70 (4,3%) animals sampled. The virus was isolated from spleen of a positive animal and then characterized as PCV2 type b, sporadically found in pig herds since 2004 and now recognized as the predominant genotype of PCV2 worldwide. Positive animals were sampled where the domestic pig population is higher, suggesting a possible exchange of PCV2 between domestic pigs and wild boars. Further studies, focused on PCV2 genetic variability, will provide a better understanding about the role of wild boar in PCV2 epidemiology.

INTRODUZIONE

Il Circovirus Suino Tipo 2 (PCV2) è considerato l'agente causale della Sindrome da Deperimento Multisistemico Post-svezzamento (PMWS)(Allan et al, 1999) e di altre forme patologiche che vengono oggi raggruppate, con il termine di "Patologie da Circovirus Suino" (PCVD), come la Sindrome Dermatite-nefrite (PDNS), patologie respiratorie, enteriti e disordini riproduttivi (Segalès et al., 2005)

La PMWS, tra le cosiddette PCVD è quella che presenta il maggiore impatto economico, con un costo annuo per la suincoltura Europea stimato in circa 600 milioni di euro. Il PCV2 infetta i suidi che sono gli ospiti naturali, mentre le specie animali diverse da questi ultimi non sarebbero sensibili all'infezione (Segalés e Domingo 2002).

La PMWS colpisce prevalentemente suini di 5-15 settimane d'età e la sintomatologia è caratterizzata da un aumento della mortalità, da deperimento, da quadri di linfadenomegalia generalizzata, da patologia respiratoria ed occasionalmente da pallore della carcassa, ittero e diarrea. La diagnosi di PMWS è storicamente supportata dall'interpretazione dei sintomi clinici ed anatomopatologici, peraltro non patognomonic, e si completa con la valutazione dei quadri istopatologici linfonodali e con la quantificazione, attraverso metodi biotecnologici, del DNA dell'agente eziologico.

L'infezione da PCV2 nel cinghiale (*Sus scrofa*) è stata ampiamente dimostrata in studi eseguiti in Spagna (Vicente et al., 2004), Germania (Knell et al., 2005), Ungheria (Csagola et al., 2006) e Italia (Pettrini et al., 2008), basati sulla ricerca del DNA o dell'antigene virale rispettivamente tramite PCR e immunistochimica (IHC).

Indagini sierologiche condotte in Europa per evidenziare la presenza di anticorpi anti-PCV2 in campioni di sangue di cinghiale, hanno dimostrato elevate prevalenze in Belgio (Sanchez et al., 2001), Spagna (Vicente et al., 2004, Ruiz-Fons et al., 2006) e Repubblica Ceca (Sedlak et al., 2008).

Da un punto di vista genetico esiste una certa variabilità tra ceppi di PCV2 isolati in diverse aree geografiche (Fenaux et al., 2000), senza che esista una correlazione tra la sequenza genetica e la patogenicità del virus (Dupont et al. 2008).

Recentemente, per uniformare la nomenclatura relativa ai genotipi di PCV2 il "Consorzio Europeo sulla PCVD" ha proposto una nomenclatura unificata. E' stata pertanto suggerita la suddivisione in 3 genotipi, PCV2a, PCV2b e PCV2c, sulla base della differenza genetica ottenuta dalla comparazione delle sequenze dell'ORF2 virale. In questo contesto il genotipo PCV2a è stato prevalente nella popolazione suina mondiale fino al 2003 ed è stato successivamente soppiantato dal genotipo PCV2b, che tutt'ora appare quello prevalente (Guo et al., 2010).

Da un punto di vista epidemiologico il ruolo del cinghiale non è ancora stato chiarito; diversi lavori scientifici basati sull'analisi filogenetica dell'ORF2 di ceppi di PCV2 isolati nel cinghiale e nel suino domestico hanno evidenziato omologie prossime al 100% (Knell et al., 2005-Csagola et al., 2006) mentre recentemente, in un lavoro basato sul sequenziamento dell'ORF2 e dell'ORF3 di ceppi di PCV2, è stata dimostrata una netta differenza genetica, tra ceppi isolati dal cinghiale e dal suino (Reiner et al., 2010).

Gli obiettivi del presente lavoro sono:

- valutare la prevalenza dell'infezione da PCV2 nel cinghiale nel territorio della provincia di Reggio Emilia;
- valutare il genotipo di PCV2 circolante e confrontare questo dato con le informazioni raccolte da altri lavori scientifici su questo argomento;
- valutare una possibile relazione epidemiologica tra la presenza di PCV2 nel cinghiale, la diffusione di quest'ultimo e la presenza di allevamenti suinicoli sul territorio.

MATERIALI E METODI

Il Campionamento

Durante la stagione venatoria 2009-2010 sono stati prelevati 70 campioni di milza da altrettanti cinghiali abbattuti all'interno di due Ambiti Territoriali di Caccia ATC (3 e 4), comprendenti 5 comuni (Baiso, Castellarano, Castelnovo ne'Monti, Viano, Villa Minozzo) della zona collinare e montana della provincia di Reggio Emilia. Il campionamento è stato eseguito grazie alla collaborazione dei cacciatori di due squadre di caccia in braccata, esercitanti l'attività venatoria nella zona di montagna (ATC4), di un gruppo di caccia al cinghiale in girata che svolge la sua attività nella zona di collina (ATC3), di un' Azienda Faunistico-Venatoria sita sempre nel territorio

collinare. Inoltre grazie all'attività delle guardie provinciali della Unità Operativa vigilanza caccia e pesca della provincia di Reggio Emilia, sono stati conferiti campioni provenienti da cinghiali abbattuti durante l'attività di controllo della popolazione avvenuta in due distinte aree site nella zona collinare della provincia di Reggio Emilia.

La scelta della milza come organo da prelevare, come avvenuto già in altri studi (Kneil 2005), dipende dal fatto che come tutti gli organi linfoidi è un tessuto bersaglio per il PCV2 ed è facilmente prelevabile direttamente dai cacciatori al momento dell'eviscerazione degli animali abbattuti.

Per quanto riguarda il campionamento, sono stati forniti alle squadre di caccia contenitori in plastica nei quali si richiedeva di riporre al momento dell'eviscerazione porzioni di milza di circa 8 cm, da refrigerare immediatamente.

Per ogni cinghiale abbattuto da cui è stata campionata la milza, è stata registrato il peso e la classe di età.

I campioni di milza sono stati successivamente congelati entro 24 ore dal prelievo e consegnati alla sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER).

Indagini di laboratorio

Per verificare la presenza di PCV2 nei campioni prelevati è stata utilizzata una PCR quantitativa seguendo il metodo indicato da Olvera et al. (2004).

I campioni di milza sono stati identificati ed esaminati in pool da 5, per un totale di 14 pool. In caso di riscontro positivo, ogni campione costituente il pool positivo è stato analizzato singolarmente.

I campioni risultati positivi sono stati inviati al reparto di Virologia e Sierologia Specializzata (IZSLER) per l'isolamento virale. Per quest'ultimo scopo il campione di tessuto è stato omogenato ed inoculato, nella misura di 200 µl, in colture cellulari di NLPK PCV-free (rene suino) cresciute in bottigliette da 25 ml. Le colture cellulari sono state incubate a 37°C in termostato a CO₂ per 5 giorni, al termine dei quali è stata eseguita una tripsinizzazione del substrato, sono stati prelevati 200 µl di sovrantante e su questi eseguita l'ELISA con l'impiego di anticorpi monoclonali specifici per PCV2 (3B11; 4H8; 2A11) prodotti presso il reparto di Virologia e Sierologia Specializzata. In caso di esito negativo, 200 µl di sovrantante sono stati utilizzati per ulteriori due passaggi prima di considerare la prova negativa.

In caso di isolamento virale è stata eseguita una prova di genotipizzazione, impiegando una metodica modificata rispetto a quella proposta da Horlen et al., 2007, che ha previsto l'estrazione totale del DNA virale e l'esecuzione di una PCR con l'impiego di primer per ORF2, in grado di differenziare i genotipi PCV2a e PCV2b (tabella 1). Il genotipo PCV2c non è stato preso in considerazione a causa della sua scarsa diffusione, in quanto descritto solo in Danimarca in campioni di siero prelevati da animali senza sintomatologia tra il 1980 e il 1990 (Dupont et al., 2008).

Primer reverse PCV2a	GGGGGACCAACAAAATCTC
Primer forward PCV2	CAGTTCGTACC
Primer reverse PCV2b	GGGGCTAAACCCCGCTC

Tabella 1- *Primer impiegati nella metodica PCR per la distinzione dei due sottotipi (Horlen et al., 2007).*

Table 1- *Primers used for the PCV2a and PCV2b differentiation*

Valutazione quantitativa delle popolazioni di cinghiale e suino domestico

Il cinghiale è un ungulato che normalmente non viene censito nella nostra regione e quindi la densità relativa è stata stimata sulla base del numero di abbattimenti effettuati nel 2009. Le consistenze dei suini domestici e degli allevamenti sono stati ricavati consultando la banca dati dell'Unità Operativa Vigilanza Caccia e Pesca della provincia di Reggio Emilia e l'Anagrafe nazionale zootecnica della Banca Dati Nazionali (BDN).

RISULTATI

Il campionamento

I risultati del campionamento, che ha portato al prelievo di 70 campioni di milza da altrettanti cinghiali abbattuti sono riportati in tabella 2 e figura 1.

Comune	Dati N° cinghiali	Peso (Kg)			classe di età (mesi)			
		Min	Max	Media	0-6	6-12	12-18	>18
Baiso	7	25	90	55			3	4
Castellarano	7	65	120	82.8				7
Castelnovo ne Monti	21	35	120	56.9			13	8
Viano	10	8	100	42.2	1		7	2
Villa Minozzo	25	25	90	48		6	11	8
Totale	70	8	120	54	1	6	34	29

Tabella 2- *Dati relativi ai settanta campioni prelevati: provenienza, peso minimo, medio, massimo e classi di età degli animali*

Table 2- *Data on provenance, weight (minimum, maximum and mean) and age classes of animal sampled*

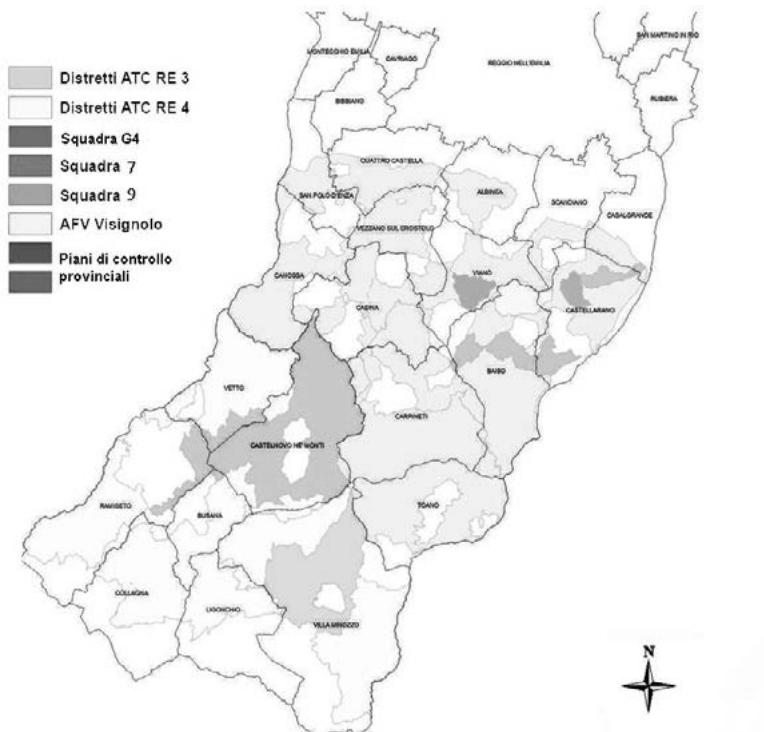


Figura 1- *Aree oggetto del campionamento*

Figure 1- *Sampled areas*

Indagini di laboratorio

L'indagine tramite Real Time PCR per PCV2, ha fornito risultati negativi in 12 pool su 14. La presenza di PCV2 è stata evidenziata, con un numero di copie di ac. nucleico virale/gr di milza pari a $1,3 \times 10^7$ e $1,5 \times 10^7$, rispettivamente nei pool 9 e 10. L'indagine sui singoli campioni costituenti il pool ha messo in evidenza la presenza di un cinghiale positivo nel pool C9 (campione n°41) con $4,1 \times 10^5$ copie di ac. nucleico virale/gr di campione e di due cinghiali positivi nel pool C10 (campioni n° 43 e 45) con $2,8 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^7$ copie di ac. nucleico virale/gr di campione rispettivamente. Tutti i campioni positivi sono stati prelevati nel comune di Castelnovo ne' Monti.

In seguito ad inoculazione su coltura cellulare del tessuto splenico risultato positivo in real Time PCR, è stato ottenuto l'isolamento di PCV2 dal campione n° 45. L'isolamento è stato confermato tramite l'impiego di una metodica immunoenzimatica (ELISA virologica) basata sull'utilizzo di anticorpi monoclonali. Il virus isolato è stato successivamente genotipizzato come PCV2b.

Valutazione quantitativa delle popolazioni di cinghiale e suino domestico

La stima della densità relativa dei cinghiali sul territorio oggetto dello studio, eseguita come accennato sul numero di animali abbattuti nella stagione di caccia precedente, ha permesso di ipotizzare una densità di cinghiali più bassa nel comune di Villa Minozzo rispetto a quella del comune di Castelnovo ne Monti poiché nel 2009 sono stati abbattuti rispettivamente 67 e 157 animali. I due comuni sopraccitati, dove hanno operato le squadre n°7 e n°9, occupano una parte dell'area localizzata nella zona sud della provincia di Reggio Emilia (figura 1). Le aree di caccia nelle quali operano le due squadre hanno caratteristiche ambientali ottimali per quanto riguarda la diffusione dei cinghiali per la presenza di ampie aree boschive.

I comuni di Castellarano, Viano e Baiso, dove la densità di cinghiali è decisamente inferiore rispetto ai comuni di Villa Minozzo e Castelnovo ne Monti, sono caratterizzati da ambienti di media-bassa collina, discretamente antropizzati, con un habitat poco favorevole per la diffusione della popolazione di cinghiali, in quanto gran parte del territorio risulta coltivato a foraggi per l'alimentazione delle vacche da latte.

La presenza degli allevamenti suinicoli nel territorio oggetto dello studio è prevalentemente rappresentata da piccoli allevamenti da ingrasso annessi ai caseifici e di conseguenza rispecchiano la distribuzione degli allevamenti bovini destinati alla produzione del parmigiano reggiano. Questo tipo di allevamento sia per motivi demografici, ma soprattutto per caratteristiche orografiche del territorio, risulta essere molto più presente nel comune di Castelnovo ne' Monti (Tabella 3).

Comuni	Consistenze capi suini domestici	n° Allevamenti suini
Baiso	1297	6
Castellarano	4000	5
Castelnovo ne Monti	5248	13
Viano	1985	3
Villa Minozzo	1224	5

Tabella 3- *Consistenza al 31 Dicembre 2009 degli allevamenti e dei capi suini nei diversi comuni dove sono avvenuti gli abbattimenti dei cinghiali*

Table 3- *Consistency of pigs and herds (31 December 2009) in municipalities of the sampled wild boar*

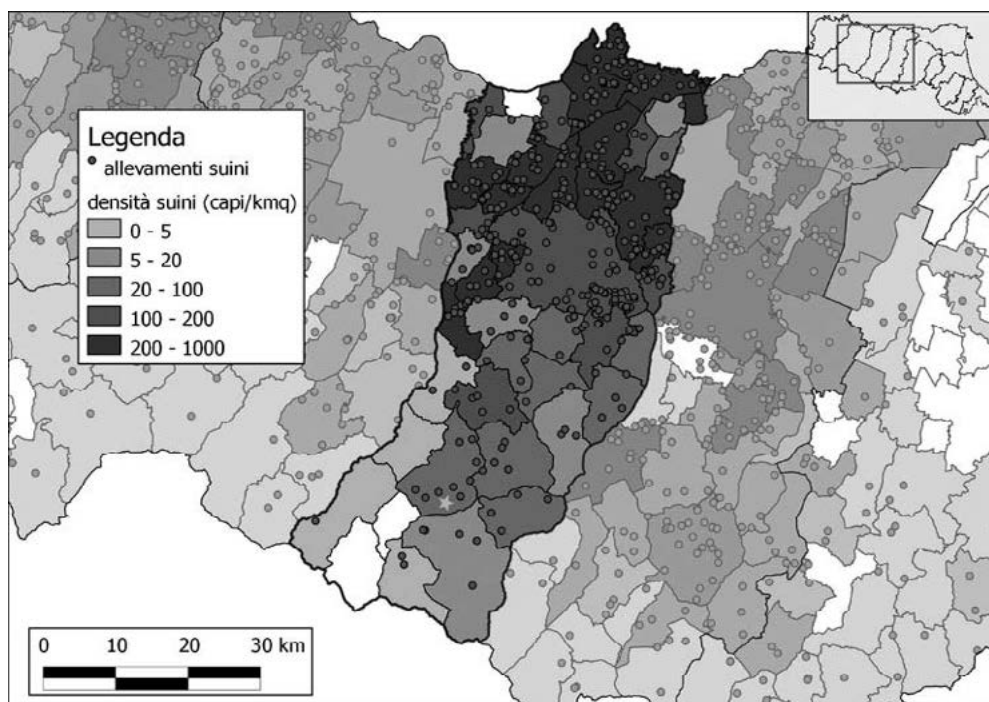


Figura 2- *Densità di suini in provincia di Reggio Emilia, distribuzione degli allevamenti nelle aree di studio e cinghiali positivi per PCV2 (stella gialla)*

Figure 2- *Swine density in the Reggio Emilia province, herds distribution and PCV2 positive wild boars (yellow star)*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare la presenza di PCV2 nella popolazione di cinghiali della zona collinare e montuosa della provincia di Reggio Emilia sebbene con una prevalenza decisamente bassa (4,3%) se confrontata con i risultati di altri studi di questo tipo eseguiti in Europa (Vicente 2004, Knell 2005, Csagola 2005).

La bassa prevalenza riscontrata può essere ricondotta a diversi fattori: tipologia di campionamento, caratteristiche del territorio in cui è stato eseguito lo studio e fattori di natura epidemiologica. Per quanto riguarda la tipologia di campionamento è fondamentale ricordare come lo studio riportato si basi su animali cacciati e per i quali non è possibile stabilire se fossero presenti quadri clinici ed anatomopatologici riconducibili a PMWS. Oltre a questo è necessario sottolineare come il 90% degli animali campionati avesse un'età superiore a 12 mesi e che il 41% del totale fosse oltre i 18 mesi d'età (Tabella 2). Quest'ultimo aspetto potrebbe aver influenzato il dato di prevalenza riportato, considerando che generalmente l'infezione da PCV2 ed i casi di PMWS nel cinghiale sono descritti con maggior frequenza tra 4 e 10 mesi (Ruiz-Fons et al, 2008).

La presenza di PCV2 è stato evidenziata nei cinghiali abbattuti in una sola area di caccia (comune di Castelnovo ne' Monti), caratterizzata da una elevata concentrazione di cinghiali e con la più alta densità di suini fra i comuni inseriti nello studio. Questi fattori sono sicuramente determinanti per favorire l'eventuale passaggio di PCV2 dall'ambiente domestico a quello selvatico ed influenzano con ogni probabilità il livello di prevalenza dell'infezione nel

cinghiale. A questo proposito, infatti, se il cinghiale può essere considerato il potenziale reservoir di virus come il pestivirus della Peste suina classica o l'herpesvirus della malattia di Aujeszky per il suino domestico, questo non è applicabile per il PCV2. Per il PCV2, infatti viene considerato più probabile il ruolo del suino domestico come fonte d'infezione per il cinghiale (Vincente et al., 2004).

Il virus isolato nei cinghiali nel presente lavoro appartiene al genotipo PCV2b, sporadico negli allevamenti di suini fino al 2004 e prevalente dopo questo periodo. Questo dato, già segnalato in altri lavori scientifici su questo argomento (Toplak et al, 2004, Reiner et al, 2010-a), rafforza l'ipotesi di un possibile legame epidemiologico fra i cinghiali ed i suini domestici che vivono nello stesso territorio.

Secondo altri autori, tuttavia, sarebbe ipotizzabile una certa indipendenza dei ceppi circolanti nel cinghiale e nel suino, senza possibilità di infezioni crociate, per le scarse possibilità di contatto tra le due specie. Anche la modalità di trasmissione del PCV2 che avviene principalmente per contatto diretto rafforzerebbe questa ipotesi (Reiner et al., 2010).

Infine la bassa prevalenza riscontrata nel presente lavoro, confrontata con studi analoghi in Europa (Vicente 2004, Knell 2005, Csagola 2005), potrebbe essere ricondotta agli effetti dell'introduzione della vaccinazione per PCV2 negli allevamenti suini. L'impiego della vaccinazione infatti, oltre ai benefici effetti sanitari nell'allevamento suino, determina una riduzione della circolazione virale all'interno degli allevamenti stessi, con possibili ripercussioni anche sulla circolazione di PCV2 nei cinghiali.

Futuri studi in questa direzione, associati ad indagini filogenetiche che permettano di valutare l'omologia tra ceppi virali circolanti nei suini domestici e quelli isolati nel cinghiale, saranno necessari per una migliore comprensione del ruolo che svolge il cinghiale nell'epidemiologia della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. Allan GM, Ellis JA. (2000) Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest.* Jan;12(1):3-14.
2. Allan GM, Mc Neilly F, Meehan BM, Kennedy S, Mackie DP, Ellis JA, Clark EG, Espuna E, Saubi N, Riera P, Bøtner A, Charreyre CE. (1999) Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol.* Apr 1;66(2):115-23.
3. Cságola A, S. Kecskeméti, G. Kardos, I. Kiss and T. Tuboly, (2006): Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boar, *Archives of Virology* 151, pp. 495–507
4. Dupont K, Nielsen EO, Bakbo P, Bækbo P, Larsen LE: Genetic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 2008, 128:56-64.
5. Fenaux M, Halbur PG, Gill M, Toth TE, Meng XJ: Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of Northern America and development of a differential PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol* 2000, 38:2494-2503.
6. Guo et al.: (2010) Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology Journal* 7:273
7. Horlen KP, Schneider P, Anderson J, et al. (2007): A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: Clinical features and association with the PCV2b genotype. *J Swine Health Prod.*;15(5):270–278
8. Knell S., Willems H., Hertampf B., Reiner (2005). Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. *Vey Microbiol* Aug 30; 109(3-4):169-177

9. Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M. (2004) :Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods*. Apr;117(1):75-80.
10. Petrini S., Gavaudan S, Barrocci S, Briscolini S, Sebastiani C., Mancini P, Panicià M, Villa R, Ferrari M (2008) Isolamento e caratterizzazione molecolare di diversi stipiti di circovirus suino tipo 2(PCV2) isolati nel cinghiale nel centro Italia. *Atti della soc. italiana di patologia ed allevamento dei suini- Salsomaggiore Terme(PR)*
11. Reiner, G., Bronnert, S., Hohloch, C., Fresen, C., Haak, I., Willems, H., Reinacher, M. (2010): Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet. Microbiol.* 145, 1–8
12. Reiner G, Bronnert B, Hohloch C, Reinacher M, Willems H. Distribution of ORF2 and ORF3 genotypes of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol.* 2010 Aug 26.
13. Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Vidal, D., Hofle, U., Villanua, D., Gauss, C., Segales, J., Almeria, S., Montoro, V., Gortazar, C., (2006): Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology* 65, 731–743
14. Sanchez, R., Nauwynck, H.J., Pensaert, M., (2001) : Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. In: *Proceedings of the Eur. Soc. Vet. Virol., St. Malo, France*, p. 122.
15. Sedlak, K., Bartova, E., Machova, J., (2008): Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *J. Wildl. Dis.* 44,777–780.
16. Segales J., Domingo M. (2002): Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pig. *A review Vet Q* 24: 109 124
17. Segalès, J., Allan ,G. M., Domingo,M., (2005): Porcine circovirus diseases. *Anim. HealthRes.Rev.*6,119–142.
18. Toplak I, Grom J, Hostnik P, Barlic-Maganja D. (2004): Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia. *Vet Rec.* Aug 7;155(6):178-80.
19. Vicente, J.,Segalés, J.,Hofle,U.,Balasch,M.,Plana-Duran,J.,Domingo,M., Gortazar, C., (2004): Epidemiological study on porcine circovirustype2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*).*Vet.Res.*35, 243–253.