

PROFILO SIEROLOGICO E VIROLOGICO DELL'INFEZIONE DA PCV2 E PRRSV IN 10 ALLEVAMENTI SUINI ITALIANI

SEROLOGIC AND VIROLOGIC PROFILE OF PCV2 AND PRRSV INFECTIONS IN 10 ITALIAN SWINE HERDS

PAVESI R.¹, CEVIDALLI A.², BLANCHAERT A.², COMINOTTI F.²,
NASSUATO C.¹, BONIOTTI B.¹, ALBORALI L.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia
² Intervet Schering-Plough Animal Health, Segrate, Milano .

Parole chiave: PCV2, PRRSV, Anticorpi, PCR

Key Words: PCV2, PRRSV, Antibodies, PCR

Riassunto: L'obiettivo di questa indagine diagnostica è quello di valutare il profilo sierologico e virologico dell'infezione da PRRSV e PCV2 in allevamenti italiani a ciclo chiuso e multisito. Sono state individuate 10 aziende, che non praticavano vaccinazione verso PRRSV e PCV2 e che presentavano comunque problematiche riconducibili a questi patogeni. In ogni azienda sono stati selezionati casualmente 5 o 10 suini per ogni categoria di età corrispondente a 1- 3/4- 8- 12- 16- 20- 24 settimane di vita. Per ogni azienda sono stati prelevati 35 o 70 campioni di sieri. Tutte le aziende sono risultate positive per PCV2 e 9 per PRRSV, a conferma dell'ampia diffusione di tali infezioni. La sieropositività dei suini è risultata elevata: il 74,9% degli animali presentano anticorpi anti-PCV2 e il 73,3% anticorpi anti-PRRSV. L'infezione da PCV2 è risultata essere più tardiva rispetto a quella da PRRSV. Nel 70% degli allevamenti la circolazione di PCV2 è stata evidenziata oltre le 16 settimane di età. È stata confermata la maggior precocità dell'infezione da PRRSV: nell'80% degli allevamenti la viremia da PRRSV si è verificata nel post svezzamento prima delle 8 settimane di età. La valutazione del profilo sierologico e virologico di queste infezioni consente di individuare l'età di esordio della malattia la durata dell'infezione e le categorie di suini interessate. La conoscenza di questi dati è importante sia al fine diagnostico sia per la programmazione degli interventi vaccinali.

Abstract: The aim of this diagnostic investigation is defining the serologic and virologic pattern of PCV2 and PRRSV in Italian closed cycle and multisite farms. 10 farms, without PCV2 and PRRSV vaccination interferences, with problems related to these viral pathogens, have been selected. In each farm 5 or 10 pigs have been randomly selected for each age category of 1- 3/4- 8- 12- 16- 20- 24 weeks. For each farm have been sampled 35 or 70 serums. Every farms were The results showed that all farms are positive for PCV2 and only 9 also for PRRSV, this confirms the wide spread of PRRSV and PCV2 infection. Confirmation is also considering the number of pigs seropositive, 74,9% of the animals have antibodies to PCV2 and 73,3% of the animals have antibodies to PRRSV. Data show that the PCV2 infection occurs late, in fact in 70% of the farms viral circulation is highlighted beyond 16 weeks of age. Is confirmed that infection with PRRSV is early, in the 80% of herds infection with PRRSV occurs before 8 weeks of age, in post-weaning. For the control of these viral diseases is important to assess, based on continuously updated data, age of onset, or the categories of those affected, and duration of viremia in order to plan interventions targeted according to each individual farm.

INTRODUZIONE

Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2) è un virus a DNA che appartiene alla famiglia *Circoviridae* genere *Circovirus*, mentre Porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV) è un virus a RNA che appartiene alla famiglia *Arteriviridae* genere *Arterivirus*. Per il settore suinicolo PCV2 e PRRSV rappresentano, ad oggi, un grave problema sanitario-economico. PCV2 è associato a diverse condizioni patologiche note come Porcine Circovirus Diseases (PCVD), tra cui la più nota è la sindrome multisistemica da deperimento post-svezzamento (PMWS) che colpisce soggetti di età compresa tra i 2 e i 4 mesi di età (Segales et al. 2002, Allan et al. 2000, Opriessning et al. 2007). La PMWS, come le altre PCVD, è una patologia ad eziologia multifattoriale, dove l'infezione da PCV2 è una condizione necessaria per la comparsa di manifestazioni cliniche e la gravità è correlata a fattori ambientali e gestionali. Tra i possibili fattori implicati nell'evoluzione patogenetica dell'infezione da PCV2, ruolo determinante sembra essere svolto dalla co-infezione con PRRSV (Rose et al. 2003). PRRSV è l'agente responsabile di una sindrome caratterizzata da turbe riproduttive nella scrofa e da forme respiratorie e mortalità (Albina et al., 1994; Houben et al., 1995). Sono diversi gli studi in cui è stata evidenziata una maggiore prevalenza dei casi di PMWS nelle aziende PRRSV positive e segni clinici più severi nei suini infettati da entrambi i patogeni (Allan et al., 2000, Harms et al., 2001, Rovira et al. 2002, Rose et al. 2003). La conoscenza della dinamica dell'infezioni da PCV2-PRRSV all'interno dell'allevamento è fondamentale per la pianificazione di un'efficace strategia di controllo. Obiettivo del lavoro è valutare l'andamento delle infezioni da PCV2 e PRRSV tramite test diagnostici di routine, al fine di ottenere profili sierologici e virologici, che consentirebbero un approccio mirato e adeguato all'evoluzione delle malattie.

MATERIALI E METODI

Protocollo di campionamento

È stato applicato un modello di campionamento di tipo cross-sectional in grado di rilevare dati in un determinato momento corrispondente al tempo in cui viene effettuata la rilevazione. Sono state individuate 10 aziende del Nord Italia che nella loro anamnesi remota presentavano problematiche riconducibili a PCV2 e/o a PRRSV, ma che non effettuavano vaccinazioni nei confronti di questi 2 patogeni. Sono state coinvolte 7 aziende multisede e 3 aziende a ciclo chiuso. Negli allevamenti italiani il 79,9% dei soggetti è risultato positivo per PCV2 (Sarli et al. 2009). In base a questo, con una prevalenza attesa di almeno il 50%, un campionamento di almeno 5 suini è sufficiente ad identificare un allevamento come PCV2 infetto o no, con un livello di confidenza del 90%. Pertanto, per ogni azienda sono stati individuati 5-10 soggetti di 1- 3/4 (svezzamento)- 8- 12- 16- 20- 24 settimane di età. I campioni di sangue sono stati prelevati contemporaneamente durante la medesima visita in allevamento e successivamente sono stati conferiti ai laboratori della sezione Diagnostica dell'IZSLER.

Esami sierologici e virologici

Su tutti i campioni è stata eseguita la ricerca di anticorpi anti-PRRSV tramite ELISA indiretta kit IDEXX e quella di anticorpi anti-PCV2 tramite ELISA competitiva kit IZS-BS. La ricerca del virus della PRRS è stata condotta tramite una reazione One-Step RT-PCR multiplex con primers specifici, descritti da Persia et al., 2001, che permettono di differenziare il genotipo europeo dal genotipo americano mentre la PCR per PCV2 è stata condotta secondo il metodo indicato da Olvera et al., 2004. Le PCR sono state eseguite su pool di 5 sieri in modo da ottenere 1 o 2 pool per ogni classe di età. La classe di età è stata considerata positiva quando almeno un pool dava esito positivo.

Analisi statistica

È stata stimata la prevalenza dei soggetti sieropositivi per PCV2 e PRRSV ed i relativi intervalli di confidenza al 95%.

Per ogni classe di età, è stata stimata la prevalenza degli allevamenti PCR positivi per PCV2 e PRRSV ed i relativi intervalli di confidenza al 95%.

Sono stati stimati i valori medi e i rispettivi intervalli di confidenza al 95% del titolo sierologico per PCV2 e per PRRSV, mediante analisi della varianza a effetti misti con variabile dipendente il titolo sierologico, variabile indipendente la categoria di età di appartenenza dell'animale ed effetto random l'azienda.

Infine mediante un modello a effetti misti con variabile dipendente il titolo sierologico, con covariate la positività in PCR e la categoria età, con effetto random l'azienda, è stata valutata la differenza in media del titolo sierologico tra soggetti PCR positivi e PCR negativi.

RISULTATI

Tutte le aziende coinvolte sono risultate sieropositive per PCV2 e 9 sono per PRRSV. Complessivamente sono stati esaminati i sieri di 630 animali (90 suini per ognuna delle 7 classi di età) e di questi 472 (74,9%) presentavano anticorpi anti-PCV2 e 462 (73,3%) presentavano anticorpi anti-PRRSV (Tab.1).

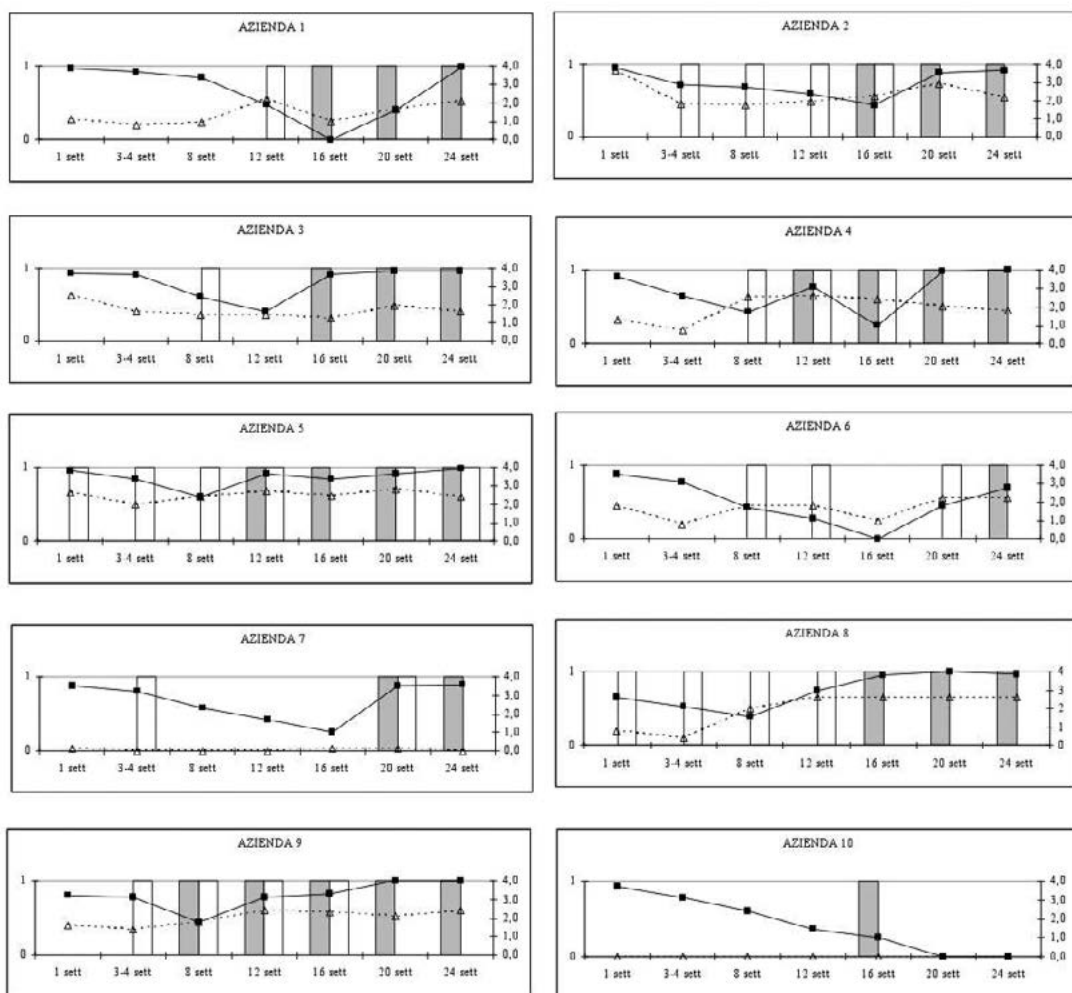
	n°	%
Aziende PCV2 positive	10	100
Aziende PRRSV positive	9	90
Suini PCV2 positivi	472	74,9 (I.C.95%: 71,9-77,9)
Suini PRRSV positivi	462	73,3 (I.C.95%: 70,3-76,3)

Tabella 1: Positività verso PCV2 e PRRSV.

Table 1: PCV2 and PRRSV positivity.

In merito all'infezione da PCV2 i titoli anticopali siano mediamente alti nella prima settimana di età e sono compresi in un range tra 2,6 e 3,9. Tendono poi a diminuire progressivamente sino alle 8- 12- 16- o 20 settimane. In 4 aziende (4-5-8-9) il titolo anticorpale medio più basso si evidenzia nei soggetti di 8 settimane, in altre 4 (1-2-6-7) si evidenzia in quelli di 16 settimane mentre nell'azienda 3 e nell'azienda 10 il titolo più basso si ha rispettivamente nei suini di 12 e 20 settimane di età. Nell'azienda 10 i soggetti di 20 e 24 settimane di età risultato sprovvisti di anticorpi nei confronti di PCV2 (Fig. 2). Il genoma virale di PCV2 viene rilevato tramite PCR a partire dai soggetti di 16 settimane di età (aziende 1-2-3-8-10), mentre in 2 aziende (7-6) viene rilevato per la prima volta nei suini di 20 e 24 settimane di età. Soltanto in 3 aziende (4-5-9) viene rilevato prima delle 16 settimane di età (Fig.2). La viremia interessa contemporaneamente più categorie di animali. Mediamente risultano positive 2,9 classi di età. Fanno eccezione l'azienda 10 che risulta positiva solo a 16 settimane e l'azienda 6 positiva solo a 24 settimane.

Per quanto riguarda l'infezione da PRRSV una sola azienda è risultata PRRSV sieronegativa. Nelle aziende sieropositive i titoli anticorpali anti-PRRSV alla nascita risultano ampiamente variabili, (da 0,1 a 3,7), tendono poi a diminuire nei suini di 3-4 settimane di età. I titoli più bassi, nella maggior parte dei casi si evidenziano nei suini di 3-4 settimane di età, in corrispondenza dello svezzamento. Solo in 2 aziende (2,3) i titoli più bassi si evidenziano a 8 e a 16 settimane di età. L'azienda 7 si comporta in maniera difforme e solo pochi soggetti risultano sieropositivi (Fig.1). 2 aziende (5,8) presentano suini viremici già nella prima settimana di vita. Il genoma virale è stato evidenziato a partire da soggetti in svezzamento in 3 aziende (2,7,9), a 8 settimane di età in altre 3 aziende (3,4,6) e a 12 settimane nell'azienda 1. La viremia è stata rilevata mediamente in 2,8 classi di età.



PCR PCV2 PCR PRRSV ; PCR: 0 = esito negativo, 1 = esito positivo

Titolo anticorpale PCV2 Titolo anticorpale PRRSV ; titolo sierologico espresso in Log10 per PCV2, in rapporto S:P per PRRSV

Fig. 1: Profili sierologici e virologici delle 10 aziende.

Figure 1: Serological and virological profile of the 10 farms.

Come si può evidenziare nelle tabelle e nei grafici di seguito riportate (Tab.2-3, Fig.2 A-B) l'infezione da PCV2 si verifica soprattutto nei soggetti di 16- 20- e 24 settimane di età mentre quella da PRRSV nei soggetti di 8- e 12 settimane di età. A 1 e a 3-4 settimane il genoma virale di PCV2 non è stato riscontrato in nessuna delle aziende coinvolte. La viremia da PCV2 è stata evidenziata a partire dalle 8 settimane anche se 9 (90%) aziende sono risultate viremiche dopo le 12 settimane e 7 (70%) dopo le 16 settimane di età (Tab.2-3, Fig.2 A) . La viremia da PRRSV viene invece più frequentemente evidenziata prima delle 8 (80%) e delle 12 (90%) settimane di et, ma a differenza di PCV2, PRRSV viene evidenziato in tutte le classi di età coinvolgendo soprattutto i soggetti di 8 e 12 settimane di età (Tab.2-3, Fig.2 B).

Età	PCV2	PRRSV
1 settimana	0 (IC95%:0 -30.85)	20 (IC95%:2.52 - 55.61)
3-4 settimane	0 (IC95%:0 -30.85)	50 (IC95%:18.71 - 81.29)
8 settimane	10 (IC95%:0.25 - 44.5)	70 (IC95%:34.75 - 93.33)
12 settimane	30 (IC95%:6.67 - 65.25)	70 (IC95%:34.75 - 93.33)
16 settimane	80 (IC95%:44.39 - 97.48)	30 (IC95%:6.67 - 65.25)
20 settimane	80 (IC95%:44.39 - 97.48)	30 (IC95%:6.67 - 65.25)
24 settimane	90 (IC95%:55.5 - 99.75)	10 (IC95%:0.25 - 44.5)

Tab.2: Prevalenza della positività in PCR per PCV2 e PRRSV.

Table 2: Prevalence of PCR positivity for PCV2 and PRRSV.

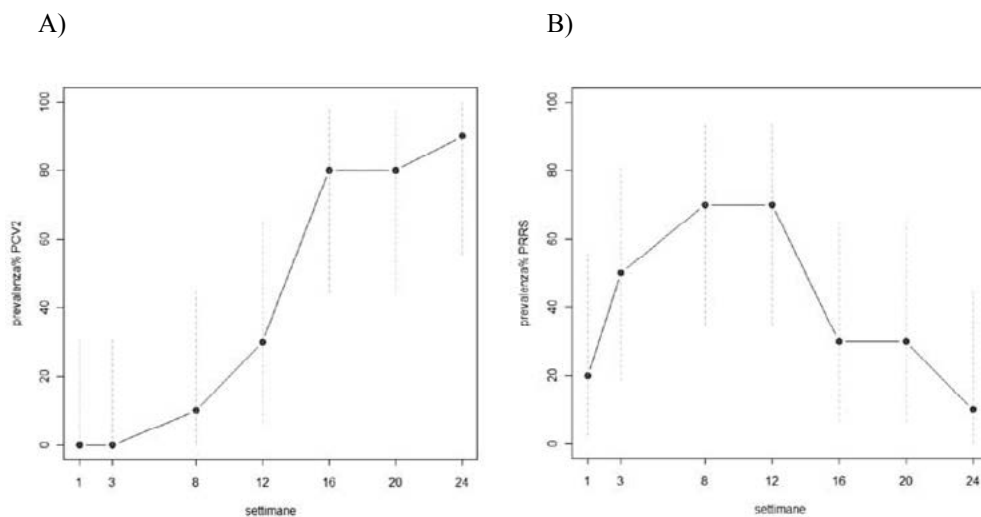


Figura 2: Prevalenza della positività in PCR per PCV2 (A) e PRRSV (B).

Figure 2: Prevalence of PCR positivity for PCV2 (A) and PRRSV (B).

	<i>Positivi per PRRSV prima delle 8 settimane</i>	<i>Positivi per PRRSV prima delle 12 settimane</i>	<i>Positivi per PCV2 dopo le 12 settimane</i>	<i>Positivi per PCV2 dopo le 16 settimane</i>
N°	8	9	9	7
%	80	90	90	70

Tab.3: Positività in PCR per PRRSV prima delle 8 - 12 settimane di età e per PCV2 dopo le 12 - 16 settimane di età **Table 3:** PRRSV PCR positivity before 8 - 12 weeks of age, PCV2 PCR positivity after 12 - 16 weeks of age.

Nelle tabelle (Tab.4 A-B, Fig.3 A-B) sono riportati i valori medi e rispettivi intervalli di confidenza al 95% stimati mediante analisi della varianza con effetto random l'azienda.

A)

Settimane	1	3-4	8	12	16	20	24
Stima del valore medio	2,914	2,45	1,698	1,118	1,426	2,747	3,202
IC95%	2,472-3,356	2,008-2,893	1,256-2,14	0,676-1,561	0,983-1,868	2,304-3,189	2,76-3,644

B)

Settimane	1	3-4	8	12	16	20	24
Stima del valore medio	1,544	0,936	1,495	1,737	1,558	1,847	1,716
IC95%	0,985-2,103	0,377-1,495	0,936-2,054	1,179-2,296	1-2,117	1,289-2,406	1,157-2,275

Tabella 4: stima dei valori medi e dei rispettivi intervalli di confidenza al 95% del log10 del titolo sierologico per PCV2 (A) e del titolo sierologico per PRRSV (B), mediante modello a effetti misti con fattore random l'azienda.

Table 4: Estimation of average values and their confidence intervals at 95% of PCV2 log 10 serological titre (A) and of PRRSV serological titer (B), using a mixed effects model with random factor the farm.

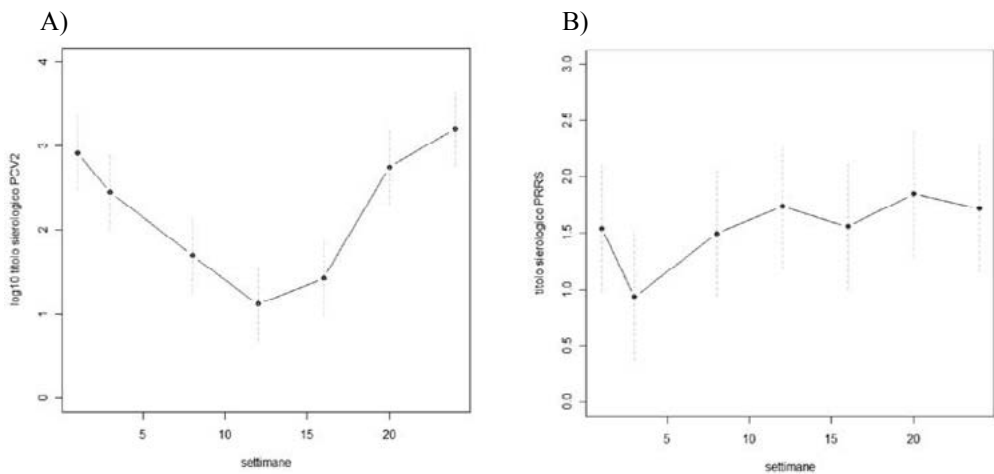


Fig.3: stima dei valori medi e dei rispettivi intervalli di confidenza al 95% del log10 del titolo sierologico per PCV2 (A) e del titolo sierologico per PRRSV (B), mediante modello a effetti misti con fattore random l'azienda.

Figure 3: Estimation of average values and their confidence intervals at 95% of PCV2 log 10 serological titre (A) and of PRRSV serological titer (B), using a mixed effects model with random factor the farm.

Sono riportati i quartili e il valore medio per i soggetti PCR positivi e PCR negativi per PCV2 e PRRSV (Tab.5-6).

PCV2	min	1 quartile	mediana	3 quartile	max	media
PCR -	0	0	2,004	3	4	1,839
PCR +	0	2,004	3	4	4	2,699

Tab.5: titolo anticorpale per PCV2 in relazione al riscontro virologico in PCR.

Table 5: PCV2 antibody titre related to virological response in PCR.

PRRSV	min	1 quartile	mediana	3 quartile	max	media
PCR -	0	0	1,2	2,2	4,6	1,29
PCR +	0	1,2	1,8	2,7	4,3	1,84

Tab.6: valore S/P per PRRSV in relazione al riscontro virologico in PCR.

Table 6: PRRSV S/P related to virological response in PCR.

Quando si tiene conto della categoria di età e della correlazione tra valori di soggetti appartenenti allo stesso allevamento, per PCV2, i soggetti PCR positivi hanno presentato un titolo sierologico di 1.13 (IC 95%: 0.81- 1.45) unità logaritmiche più grande, rispetto ai soggetti PCR negativi. Per PRRSV tale differenza non è risultata statisticamente significativa.

DISCUSSIONE

Gli anticorpi verso PCV2 rilevati alla nascita tendono a diminuire progressivamente fino a raggiungere i valori più bassi nei soggetti di 8-16 settimane di età. Gli anticorpi materni sono, infatti, normalmente evidenziabili sino alle 3-11 settimane di età (Larochelle et al., 2003, McKeown et al., 2005). Nei soggetti di età maggiore è evidente un incremento nei titoli legato probabilmente ad una stimolazione del sistema immunitario indotta dalla replicazione virale. Nella maggior parte delle aziende PCV2 è stato rilevato tramite PCR dopo le 12 e 16 settimane e il picco del titolo anticorpale è stato registrato nei soggetti di 24 settimane di età. Picco che in seguito ad infezione naturale è stato evidenziato da altri Autori a 16 settimane di età (Carasova et al., 2007). Nella maggior parte dei casi ad essere positivi in PCR sono i soggetti di 16- 20- e 24- settimane di età. Rispetto a quanto riportato in letteratura, dove il periodo a rischio per l'infezione da PCV2 è stato riconosciuto tra le 6 e le 15 settimane di età (Larochelle et al., 2003, Sibila et al., 2004), negli allevamento oggetto dello studio i suini hanno contratto l'infezione da PCV2 in una fase più avanzata. Anche in studi recenti condotti in Spagna e in Norvegia, la prima fase del post svezzamento non è più segnalata come periodo a rischio per l'infezione da PCV2, ma ad esserlo sono la fase di ingrasso comprese tra 16 e le 21 settimane. (Grau-Roma et al., 2009, Brunborg et al., 2010). In considerazione di questo spostamento in avanti del periodo d'infezione è importante adeguare i piani vaccinali applicati in azienda al fine di assicurare un'efficace copertura del periodo più a rischio. Il fatto che l'infezione da PCV2 possa verificarsi durante la fase di ingrasso piuttosto che durante la fase di svezzamento comporta senza alcun dubbio ripercussioni economiche più gravi per l'azienda.

In merito alla dinamica dell'infezione PRRSV le categorie d'età a rischio sono risultate quelle comprese tra le 8 e le 12 settimane, confermando lo svezzamento come momento cruciale per l'infezione da PRRSV. Recentemente, anche in uno studio olandese, sono stati indicati i soggetti di 9-16 settimane come soggetti ideali per rilevare il virus della PRRS in assenza di manifestazioni cliniche (Duijnhof et al., 2011). A differenza di quanto osservato

per PCV2, nel caso dei PRRSV non è stato notato un picco dei valori S/P medi senza che fossero evidenti grandi differenze tra le varie classi di età. La durata media della positività in PCR per PCV2 è risultata essere di 2,9 classi di età e per PRRSV di 2,8. La corretta interpretazione di questo dato ottenuto in uno studio di tipo cross-sectional deve portare ad una riflessione più che sulla durata di mesi della viremia sull'interessamento contemporaneo di più categorie di animali e di diversi settori dell'allevamento. Considerando le classi di età risultate più frequentemente positive in PCR negli allevamenti oggetto dello studio l'infezione da PRRSV precede di circa 2 mesi quella da PCV2. La gestione affiancata delle due problematiche ha portato a considerare che in taluni episodi il controllo della PRRS abbia potuto contenere l'impatto di PCV2.

Lo studio ha permesso di confermare la diffusione delle infezioni da PCV2 e PRRSV all'interno delle aziende italiane e delle diverse categorie di età dei suini. La conoscenza della dinamica di queste infezioni all'interno di una azienda è importante per approntare un piano di profilassi considerato che in molte realtà la gestione di una di queste patologie non può essere disgiunta da quella dell'altra. Lo studio ha inoltre messo in evidenza come nella maggior parte delle aziende testate l'infezione da PCV2 si sia presentata in una fase più tardiva rispetto a quanto sin ora riportato. È stato invece confermato che l'infezione da PRRSV ha interessato soprattutto la prima fase del post-svezzamento. Va comunque tenuto conto che trattandosi di uno studio con campionamento cross sectional che ha coinvolto 10 aziende le considerazioni proposte dovranno essere ulteriormente approfondite ed integrate con il coinvolgimento di un numero maggiore di aziende.

BIBLIOGRAFIA

1. Albina E, Madec F, Cariolet R, Torrison JL. (1994) Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet Rec* 134, 567-573.
2. Allan GM, Ellis JA (2000) Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3-14.
3. Allan GM, McNeilly F, Ellis JA, Krakowka S, Meehan B, McNair I, Walker I, Kennedy S. (2000) Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Archives of Virology* 145, 2421–2429.
4. Carasova P, Celer V, Takacova K, Trundova M, Molinkova D, Lobova D, Smola L. (2007) The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. *Res. Vet. Sci.* 83, 274–278
5. Duinhof TF, et al.. (2011) Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. *Vet. Microbiol*, doi:10.1016/j.vetmic.2011.01.001
6. Grau-Roma L, Hjulager CH, Sibila M, Kristensen CS, López-Soria S, Enøe C, Casal J, Bøtner A, Nofrarias M, Bille-Hansen V, Fraile L, Baekbo P, Segalés J, Larsen EL. (2009) Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet. Microbiol.* 135, 272–282
7. Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, Bolin SR, Lager KM, Morozov I, Paul PS. (2001) Experimental reproduction of severe disease in CD/CD Pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology* 38, 528–539.
8. Houben S, Van Reeth K, Pensaert MB (1995) Pattern of infection with the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on swine farms in Belgium. *J. Vet. Med.* 342, 209–215

9. Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. (2003) Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 67, 114–120
10. McKeown NE, Opriessnig T, Thomas P, Guenette DK, Elvinger F, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. (2005) Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2, *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 12, 1347–1351
11. Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segales 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* 117, 75-80.
12. Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. (2007) Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19, 591-615.
13. Persia D, Pacciarini ML, Cordioli P, Sala G. (2001) Evaluation of three RTPCR assays for the detection of porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples. In: *Proceedings of the X International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, Salsomaggiore-Parma, Italy, 440-441.
14. Rodriguez-Arriola M, Segalés J, Calsamiglia M, Resendes AR, Balasch M, Plana-Duran J, Casal J, Domingo M. (2002) Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome, *American Journal of Veterinary Research* 63, 354–357
15. Rose N, Larour G, Le Diguerher G, Eveno E, Jolly JP, Blanchard P, Oger A, Le Dimna M, Jestin A, Madec F. (2003) Risk factors for porcine Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Prev. Vet. Med.* 61, 209–225.
16. Rovira A, Balasc M, Segales J *et al.* (2002) Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *J Virol* 76: 3232-3239.
17. Sarli G, Ostanello F, Morandi F, Fusaro L, Gnudi M, Bacci B, Nigrelli A, Alborali L, Dottori M, Vezzoli F, Barigazzi G, Fiorentini L, Sala V, Leotti G, Joisel F. (2009) Application of a protocol for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in Italy. *Vet Rec* 164, 519-523
18. Segalés J, Domingo M. (2002) Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24, 109-124.
19. Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Blanchard P, Badiella L, Le Dimna M, Jestin A, Domingo M. (2004) Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am. J. Vet. Res.* 65, 88–92