Praca oryginalna *Original paper*

Pierwszy przypadek poodsadzeniowego wielonarządowego zespołu wyniszczającego świń w Polsce

TOMASZ STADEJEK, KATARZYNA PODGÓRSKA, PIOTR KOŁODZIEJCZYK**, ROBERT BOGUSZ, WOJCIECH KOZACZYŃSKI*, ZYGMUNT PEJSAK

Zakład Chorób Świń, *Zakład Anatomii Patologicznej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
**Laboratorium Diagnostyki Weterynaryjnej San-Vit, ul. Miodowa 6a, 62-200 Gniezno

Stadejek T., Podgórska K., Kołodziejczyk P., Bogusz R., Kozaczyński W., Pejsak Z.

First report of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Poland

Summary

The present study describes first clinically detected and confirmed by laboratory methods case of PMWS in Poland. The investigation was carried out in a large farrow-to-finish farm producing 40 000 fatteners per year. In the spring of 2000, growth retardation, wasting and respiratory disorders affected 20% of weaners and 30% of fatteners. Nineteen weaners and 11 fatteners with different degrees of wasting, respiratory disorders, skin paleness and hemorrhagic skin lesions (fatteners only) were necropsied. Post-mortem examination revealed the presence of inflammatory signs in lymphoid tissues, enlarged lymph nodes, non-collapsed lungs, enlarged livers, enlarged and pale kidneys with generalized cortical petechiae. Sections of lymph nodes were submitted for histopathological examination and in situ hybridization. Moreover, virus isolation in PK15 cell line was attempted. Histopathological analysis of lymph nodes revealed different degrees of lymphatic depletion and histiocitic infiltrations, giant cells and intracytoplasmic inclusion bodies. In situ hybridization with the use of a specific for PCV2 digoxigenin labelled DNA probe confirmed the abundant presence of PCV2 DNA within lesions in lymph nodes. A peroxidase assay indicated PCV2 replication in the inoculated cell line. Gross and histopathological lesions and the presence of PCV2 antigens in lymphoid tissues confirmed the presence of PMWS in a Polish swine herd. Clinical signs and laboratory examinations indicated that PDNS and PMWS coexisted in the herd. This suggests that PCV2 could be an important factor in an aetiology of PDNS.

Keywords: PMWS, in situ hybridization, porcine circovirus

Nową zakaźną chorobę świń charakteryzującą się wyniszczeniem organizmu, zaburzeniami oddechowymi i powiększeniem węzłów chłonnych zdiagnozowano po raz pierwszy w Kanadzie w 1996 r. Ze względu na występowanie głównie u prosiąt w okresie po odsadzeniu (w 5-12 tygodniu życia) określono ją jako poodsadzeniowy wielonarządowy zespół wyniszczający świń (postweaning multisystemic wasting syndrome – PMWS) (4). Obecnie liczne doniesienia potwierdzają rozpoznanie PMWS w wielu krajach świata, często w stadach o wysokim statusie zdrowotnym (4, 9, 27). Uważa się, że PMWS jest chorobą o wieloczynnikowej etiologii, przy czym warunkiem niezbędnym jest zakażenie cirkowirusem świń typu 2 (porcine circovirus type 2 – PCV2). Wielokrotnie podejmowane próby doświadczalnego wywołania objawów PMWS poprzez zakażenie PCV2 wykazały, że konieczne jest oddziaływanie dodatkowych czynników zakaźnych (wirus zespołu rozrodczo-oddechowego świń – PRRSV, parwowirus świń – PPV) (1, 3, 8, 10, 11, 14, 23) lub niezakaźnych (hemocjanina mięczaków z niekompletnym adjuwantem Freunda) (13, 15). Jednak ostatnie doniesienia na ten temat wskazują, że objawy PMWS można wywołać zakażając świnie wyłącznie PCV2 bez dodatkowej stymulacji (2, 6, 16).

Obecnie przyjmuje się trzy podstawowe kryteria, których spełnienie jest koniecznym warunkiem pozytywnego rozpoznania PMWS: (I) wystąpienie objawów klinicznych, do których należy wyniszczenie organizmu, bladość skóry, powiększenie węzłów chłonnych (szczególnie pachwinowych i krezkowych); (II) obecność charakterystycznych zmian obserwowanych w badaniu mikroskopowym węzłów chłonnych, obejmujących ubytek komórek limfoidalnych, nacieki histiocytarne, obecność ciałek wtrętowych w cytoplazmie histiocytów i tworzenie się wielojądrowych komórek olbrzymich, oraz (III) potwierdzenie występowania antygenu lub DNA PCV2 w obrębie zmian (4, 24, 25).

Inne zespoły chorobowe świń, w których przypuszczalnie ma udział PCV2, to zespół skórno-nerkowy (porcine dermatitis and nephropathy syndrome – PDNS), drżączka u nowo narodzonych prosiąt i zespół oddechowy świń (PRDC) (7, 9, 12, 28). Prawdopodobieństwo udziału PCV2 w rozwoju wielu zespołów chorobowych powoduje, że niekiedy do określenia zaburzeń stanu zdrowia, w przebiegu których stwierdza się zakażenie tym wirusem, stosuje się nazwę „cirkowiroza" (circovirosis) lub choroba związana z cirkowirusem świń (porcine circovirus associated disease – PCVD) (5, 9, 24).

Celem opracowania jest przedstawienie danych na temat pierwszego potwierdzonego badaniami laboratoryjnymi przypadku PMWS w Polsce.

Materiał i metody

Opis gospodarstwa. Gospodarstwo B jest wielkotowarową fermą świń o zamkniętym cyklu produkcji. Stado podstawowe w momencie wybuchu choroby liczyło około 2400 loch. Roczna produkcja tuczników wynosiła około 40 000 sztuk. Prosięta odsadzano w 24.-25. dniu życia i na wszystkich etapach produkcji przestrzegano zasady: całe pomieszczenie pełne–całe pomieszczenie puste. Stado podstawowe objęte było immunoprofilaktyką swoistą przeciw różycy, parwowirozie i kolibakteriozie. Przy odsadzaniu przez 2 tygodnie profilaktycznie podawano tiamulinę (100 ppm) i oksytetracyklinę (500 ppm). Od co najmniej 1994 r. stado było zakażone PRRSV. Z wyjątkiem rocznego okresu, w którym doszło do wystąpienia ostrych objawów PRRS, mimo braku immunoprofilaktyki swoistej, nie obserwowano istotnych problemów w rozrodzie i ze strony układu oddechowego. Od sierpnia 1998 r. do lipca 1999 r. prowadzono remont stada podstawowego przez wprowadzenie w sumie 1200 loszek o wysokim statusie zdrowotnym. Kolejne grupy zwierząt poddawano aklimatyzacji i włączano do stada podstawowego w 4 grupach.

Objawy kliniczne i badanie sekcyjne. W marcu 2000 r. u około 30% tuczników w wieku 80-100 dni zaobserwowano podwyższenie wewnętrznej ciepłoty ciała (w.c.c.), kaszel, bladość skóry i zahamowanie przyrostów masy ciała (m.c.). Pojawiła się również wodnista biegunka o szarej barwie, która nie poddawała się leczeniu antybiotykami. U 1-2% tuczników stwierdzano na skórze łopatek, zadu i kończyn tylnych obecność różnego typu wybroczyn oraz strupów. U większości zwierząt zmiany skórne cofały się samoistnie po 2-3 tygodniach. W tym czasie w sektorze tuczu doszło do obniżenia się średnich dobowych przyrostów m.c. z 745 g do 600 g oraz wzrostu odsetka padnięć z 0,3-1% do 10%. Odsetek zwierząt poddawanych selekcji wzrósł z 5 do 10%. W zależności od nasilenia objawów, okres tuczu do wagi ubojowej wzrósł o 15-30 dni. Badanie laboratoryjne wykonane w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym potwierdziło wystąpienie PDNS (18).

W ciągu miesiąca od stwierdzenia pierwszych objawów PDNS zaburzenia stanu zdrowia zaczęły dotyczyć coraz młodszych grup wiekowych. Obejmowały one zahamowanie przyrostów m.c. i bladość skóry (ryc. 1), duszność, kaszel, podwyższenie w.c.c. Szczyt zachorowań przypadł na maj 2000 r., kiedy zahamowanie przyrostów m.c., wyniszczenie i duszność stwierdzano u 20% warchlaków. Objawy te ustępowały około 60. dnia życia i były przyczyną spadku średnich dobowych przyrostów m.c. z 400 g do 320 g. Średnia m.c. odchowanych prosiąt w momencie przemieszczenia ich do sektora tuczu w 70. dniu życia spadła z 26 do około 22 kg. Zaobserwowano również wzrost odsetka padnięć z 2 do 5%.



Ryc. 1. Na pierwszym planie warchlak z objawami PMWS – bladość, wychudzenie, zahamowanie przyrostu masy ciała

Ubojowi diagnostycznemu, a następnie badaniu sekcyjnemu poddano 19 warchlaków w wieku 50 dni i 11 tuczników w wieku 90 dni wykazujących opisane objawy kliniczne.

Badanie mikroskopowe i hybrydyzacja *in situ* do wykrywania DNA PCV2. Do badania mikroskopowego i metodą hybrydyzacji *in situ* (22) pobrano wycinki węzłów chłonnych i nerek od 4 tuczników oraz węzłów chłonnych od 6 warchlaków. Wycinki narządów wewnętrznych utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie i zatapiano w parafinie, po czym wykonywano preparaty histologiczne. Preparaty z węzłów chłonnych i nerek barwiono hematoksyliną i eozyną według standardowej procedury, natomiast preparaty z węzłów chłonnych umieszczone na szkiełku mikroskopowym ProbeOn (Fisher Scientific) poddawno hybrydyzacji *in situ* z sondą DNA. Hybrydyzację wykonywano przy użyciu urządzenia MicroProbe (Fisher Scientific) składającego się z inkubatora (MicroProbe Incubator), uchwytu szkiełek (MicroProbe Slide Holder) oraz zestawu zbiorników na bufory (MicroProbe Staining Station). Po odparafinowaniu i nawodnieniu preparatów w buforze do hybrydyzacji (Automation buffer, Biomeda) nadtrawiano tkankę roztworem pepsyny (Sigma) w buforze do hybrydyzacji (6700 jednostek/ml, pH 2,0) przez inkubację w 37°C przez 10 min. a następnie w 105°C przez 8 min. Po dwukrotnym płukaniu w buforze do hybrydyzacji DNA poddawano denaturacji formamidem (Sigma) w 105°C przez 5 min.

W celu wykrycia obecności DNA PCV2 wykorzystano oligonukleotydową sondę znakowaną digoksygeniną (5'-/5DigN/CAG TAA ATA CGA CCA GGA CTA CAA TAT CCG TGT AAC CAT G-3') (19). Hybrydyzację z sondą DNA wykonywano w 37°C przez 60 min. w 5 nM roztworze sondy w buforze zawierającym 22,5% dejonizowanego formamidu, 7,5% siarczanu chondroityny, 5 × SSC, 50 mM PBS (Sigma), 0,25% Blocking Reagent (Roche).

Po przeprowadzeniu hybrydyzacji preparaty płukano dwukrotnie w buforach 0,5 × SSC i 0,25 × SSC, a następnie inkubowano w buforze 1 (100 mM Tris, 1% surowicy

owczej i 0,3% Triton X-100, 150 mM NaCl, pH 7,5) w 37°C przez 5 min. W celu wykazania hybrydyzacji sondy preparaty inkubowano w 37°C przez 60 min. z roztworem przeciwciał dla digoksygeniny znakowanych alkaliczną fosfatazą (Anti-Digoksygenin AP Fab Fragments, Roche) rozcieńczonych 1 : 500 w buforze 1.

Preparaty dwukrotnie płukano w następujących buforach: buforze 1, buforze do hybrydyzacji oraz buforze 2 (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, 0,4% Tween 20, 0,25% Brij 35, pH 9,5). W następnym etapie poddawano je inkubacji w 37°C w obecności 2% roztworu substratu dla alkalicznej fosfatazy (NBT/BCIP, Roche) w buforze 2. Inkubację prowadzono do momentu osiągnięcia wyraźnego zabarwienia (5-30 min.). Substrat odpłukiwano w buforze 3 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) i w wodzie destylowanej. Barwienie kontrastowe wykonywano przez 2 min. kąpiel w 1,5% roztworze wodnym barwnika Fast Green (Sigma). Następnie preparaty utrwalano etanolem, suszono i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym.

Jako kontrolę dodatnią hybrydyzacji *in situ* stosowano preparaty węzłów chłonnych świń z ostrą postacią PMWS otrzymane z Uniwersytetu w Barcelonie (Hiszpania). Kontrolę ujemną stanowiły preparaty wykonane z węzłów chłonnych świń zdrowych.

Izolacja PCV2. W celu wykazania obecności PCV2 w tkance węzłów chłonnych wykorzystano wolną od zakażeń PCV linię komórkową nerki świni PK-15, otrzymaną z National Animal Disease Center, Ames, Iowa USA (NADC). Materiałem do izolacji była mieszanina zhomogenizowanych w PBS węzłów chłonnych pobranych podczas badania sekcyjnego. Homogenizat mieszano z zawiesiną hodowli komórkowej z dodatkiem bydlęcej surowicy płodowej (7%), L-glutaminy (292 mg/100 ml) i antybiotyku (gentamycyna 5 mg/100 ml), a następnie wprowadzano do butelek o powierzchni wzrostu 25 i 75 cm^2 oraz do 6-dołkowej płytki (Nunc, Nunclon™ Delta Surface). Butelki i płytkę inkubowano w 37°C w atmosferze 5% CO_2 do osiągnięcia około 50% pokrycia powierzchni wzrostowej przez komórki. Płyn odżywczy zlewano znad hodowli, zastępowano roztworem glukozaminy (6% w płynie Hanksa) i inkubowano 30-40 min. w 37°C. Następnie roztwór glukozaminy zastępowano płynem odżywczym i kontynuowano hodowlę do momentu osiągnięcia pełnego pokrycia powierzchni wzrostu butelek i płytki.

W celu stwierdzenia zakażenia wirusem PCV2 komórki w basenikach płytki poddawano reakcji immunoenzymatycznej (peroxidase linked antibodies assay – PLA) (20) z wykorzystaniem surowic specyficznych dla PCV1 i PCV2 umożliwiających wybarwienie komórek zakażonych odpowiednio PCV1 i PCV2. W przypadku braku lub niskiej liczby zakażonych (zabarwionych) komórek wykonywano ich nadkażenie. W tym celu 3-krotnie zamrożoną i rozmrożoną hodowlę komórek z butelki 25 cm^2 łączono z zawiesiną komórek z butelki 75 cm^2 w płynie odżywczym. Zawiesinę wprowadzano do nowych butelek 25 i 75 ml oraz do 6-dołkowej płytki. Następnie hodowlę poddawano inkubacji z glukozaminą jak przy pierwszym pasażu. Procedurę tę powtarzano do uzyskania znacznej liczby zakażonych wirusem komórek.

Tab. 1. Wyniki badania sekcyjnego 19 warchlaków i 11 tuczników z fermy B (% zmian)

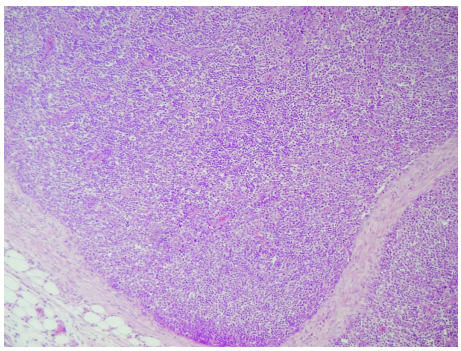
Cecha	Warchlaki	Tuczniki
Zły stan ogólny	100	18,0
Bladość skóry	15,7	90,9
Wybroczyny na skórze	0	72,7
Powiększenie pachwinowych węzłów chłonnych	57,8	100
Włóknikowe zapalenie osierdzia	73,6	90,9
Zmiany w płatach doczaszkowych płuc	78,9	90,9
Zmiany w płatach doogonowych płuc	26,3	27,3
Powiększenie i zwyrodnienie wątroby	89,5	72,7
Powiększenie śledziony	36,8	90,9
Powiększenie i bladość nerek	52,6	100
Wybroczyny w pęcherzu	15,8	54,5

Wyniki i omówienie

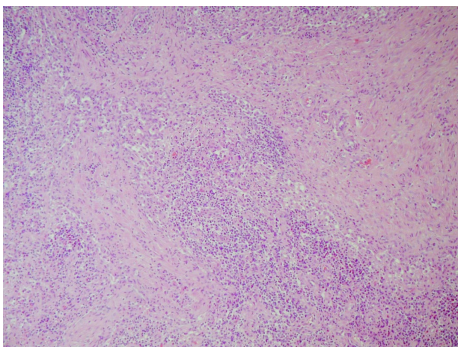
Wybrane wyniki badania klinicznego i sekcyjnego zawarto w tabeli 1. Wszystkie warchlaki oraz 2 z 11 tuczników były w bardzo złej kondycji. Spośród 19 warchlaków poddanych badaniu sekcyjnemu jedynie 15,7% (3 z 19) wykazywało bladość skóry. Bladość skóry stwierdzono natomiast u 90,9% (10 z 11) tuczników, przy czym u 72% (8 z 11) z nich występowały zmiany skórne pod postacią wybroczyn. U około 57,9% (11 z 19) warchlaków i wszystkich badanych tuczników występowało powiększenie węzłów chłonnych pachwinowych, które wykazywały oznaki przekrwienia na przekroju. U większości zwierząt (73,6% warchlaków i 90,9% tuczników) zaobserwowano naloty włóknikowe na worku osierdziowym.

W większości przypadków stwierdzano zmiany w płucach dotyczące głównie płatów doczaszkowych (78,9% warchlaków i 90,9% tuczników). Tkanka płucna w obrębie zmian charakteryzowała się zwątrobieniem i konsystencją tęgą. U 26,3% (5/19) warchlaków i 27,2% (3/11) tuczników występowały ogniskowe, wyraźnie odgraniczone zmiany w płatach doogonowych płuc. Badanie sekcyjne wykazało powiększenie wątroby. Konsystencja wątroby była krucha, barwa czerwono-żółta, w niektórych przypadkach na powierzchni narządu występowały wybroczyny. Zmiany dotyczące śledziony (powiększenie, zawały brzeżne, wybroczyny) zaobserwowano u 36,8% (7/19) warchlaków i 90,9% (10/11) tuczników. Powiększenie nerek, czasami 2-krotne, bladość i/lub obecność wybroczyn pod torebką zaobserwowano u 52,6% (3/19) warchlaków i u wszystkich tuczników. Wybroczyny na błonie śluzowej pęcherza moczowego widoczne były u 15,7% (3/19) warchlaków oraz u 54,5% (6/11) tuczników.

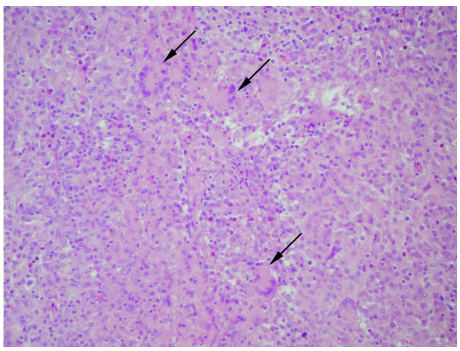
Zaobserwowane objawy kliniczne są typowe dla PMWS. Quintana i wsp. (19) podają jako najbardziej charakterystyczne wyniszczenie organizmu, powiększenie węzłów chłonnych, śródmiąższowe zapalenie płuc, włóknikowe zapalenie opłucnej i włóknikowe



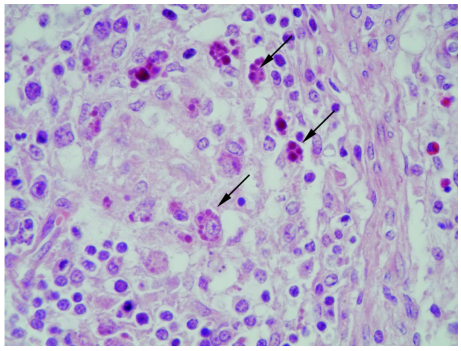
Ryc. 2. Struktura węzła chłonnego świni zdrowej. Barwienie HE, powiększenie 100 ×



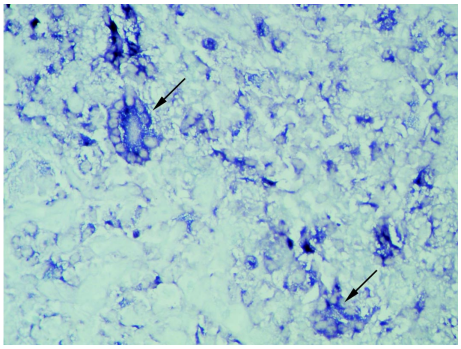
Ryc. 3. Struktura węzła chłonnego świni z objawami PMWS. Ubytek utkania limfatycznego. Barwienie HE, powiększenie 100 ×



Ryc. 4. Struktura węzła chłonnego świni z objawami PMWS. Strzałki wskazują wielojądrowe komórki olbrzymie. Barwienie HE, powiększenie 200 ×



Ryc. 5. Struktura węzła chłonnego świni z objawami PMWS. Strzałki wskazują ciałka wtrętowe w cytoplazmie histiocytów. Barwienie HE, powiększenie 600 ×



Ryc. 6. Wycinek węzła chłonnego świni z objawami PMWS, hybrydyzacja *in situ*. Ciemnoniebieskie zabarwienie wskazuje na obecność DNA PCV2. Widoczne wielojądrowe komórki olbrzymie z zabarwioną cytoplazmą. Powiększenie 400 ×

zapalenie osierdzia. Do rzadziej występujących objawów PMWS zalicza się także powiększenie i bladość nerek, biegunkę, powiększenie lub atrofię wątroby, żółtaczkę, owrzodzenie żołądka i zapalenie stawów (22, 25). Część opisanych zmian związana jest najprawdopodobniej z zakażeniami wtórnymi często obserwowanymi w przebiegu PMWS. Stwierdzone u tuczników zmiany dotyczące skóry i nerek należą do typowych objawów obserwowanych przy PDNS.

Obraz kliniczny i zmiany anatomopatologiczne w przebiegu PMWS nie są specyficzne, mogą także różnić się w znacznym stopniu między poszczególnymi przypadkami (19, 22, 25). Laboratoryjne potwierdzenie diagnozy PMWS stwarza pewne trudności ze względu na powszechne występowanie PCV2 w populacji świń (4, 22). Wynika stąd niewielka przydatność metod wykrywania obecności wirusa. W przypadku PMWS konieczne jest wykazanie występowania charakterystycznych zmian morfologicznych i obecności PCV2 w ich obrębie.

Badanie mikroskopowe węzłów chłonnych warchlaków i tuczników wykazało ubytek komórek limfoidalnych (ryc. 2, 3), obecność nacieków histiocytarnych i neutrofili a także wewnątrzcytoplazmatycznych ciałek wtrętowych (ryc. 5) i wielojądrzastych komórek olbrzymich (ryc. 4). Zmiany te były silniej wyrażone w preparatach pochodzących od warchlaków. Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów (22, 26). W wielu przypadkach stwierdzano cofanie się zmian, które w późniejszych fazach choroby mogą być słabo wyrażone lub całkowicie zanikać. Podobnie obniżeniu może ulegać ilość wirusa w obrębie zmian histopatologicznych. Przy użyciu metody ISH wykazano obecność dużej ilości DNA PCV2 w obrębie wyżej opisanych zmian we wszystkich preparatach pochodzących od warchlaków i tylko w jednym od tucznika (ryc. 6). Interesujące jest, że tucznik ten znajdował się w dobrej kondycji i badanie mikroskopowe nerek nie wykazało obecności zmian charakterystycznych dla PDNS. Pozostałe tuczniki bez względu na kondycję wykazywały obecność zmian zapalnych rozplemowo-wysiękowych z rozplemem komórek mezangium i pojawieniem się wysięku, prowadzącego do martwicy kłębuszków nerkowych. W świetle kanalików nerkowych stwierdzano obecność eozynochłonnej substancji. Zmiany tego typu są charakterystyczne w przebiegu PDNS (18, 28).

Inokulacja hodowli komórkowej homogenizatem węzłów chłonnych wywołała efekt cytopatyczny charakterystyczny dla PCV. Obecność tego wirusa potwierdzono immunoenzymatycznie przy użyciu surowicy swoistej dla PCV2. Uzyskany izolat jest pierwszym szczepem PCV2 wyizolowanym w Polsce.

Przyczyna nagłego pojawienia się PMWS i PDNS w fermie B nie została ustalona. Początkowe podejrzenia o zawleczenie PCV2 z wprowadzonymi w celu remontu stada loszkami nie potwierdziły się. Badanie surowic od świń z fermy B z 1994 r. wykazało obecność przeciwciał dla tego wirusa w tym okresie. Należy podkreślić, że przeciwciała dla PCV2 wykryto również w stadzie, z którego zakupiono loszki remontowe. Nie wydaje się więc prawdopodobne, że do klinicznego ujawnienia się zakażenia PCV2 przyczynił

się remont stada podstawowego. Jednym z elementów podejrzewanych o współdziałanie z PCV2 w rozwoju PMWS jest zakażenie PRRSV (3, 10, 23). Ponieważ wprowadzane loszki remontowe nie były odporne na zakażenie PRRSV, a skuteczność aklimatyzacji nie była kontrolowana laboratoryjnie, można przyjąć, że nie wszystkie zwierzęta przechorowały PRRS przed wprowadzeniem do rozrodu. Mogło to doprowadzić do intensyfikacji krążenia PRRSV w stadzie, a przez to przyczynić się do wystąpienia opisanych objawów.

Przeprowadzone badania pozwalają na stwierdzenie, że w fermie B doszło do jednoczesnego ujawnienia się PMWS i PDNS. Obecność PCV2 w węzłach chłonnych tuczników z PDNS pozwala na przypuszczenie, że wirus ten może brać udział w rozwoju również tego zespołu. Podobne obserwacje opisali inni autorzy (7, 17, 21, 28). Zwykle PDNS nie jest źródłem dużych strat ekonomicznych jednak w omawianym przypadku straty wynikające z konieczności wybrakowania 10% tuczników oraz wydłużeniu okresu tuczu o 30 dni należy uznać za wyjątkowo dotkliwe.

Wnioski

Niniejsze opracowanie jest pierwszym na temat występowania PMWS w Polsce. Obecność DNA PCV2 i charakterystycznych zmian mikroskopowych sugeruje, że wirus ten może mieć udział również w rozwoju PDNS. Wystąpienie PMWS i PDNS wiąże się ze znacznymi stratami w produkcji świń. Badanie mikroskopowe wycinków węzłów chłonnych oraz metoda ISH umożliwiają rozpoznanie PMWS jako źródła charłaczenia świń w okresie poodsadzeniowym.

Piśmiennictwo

1. *Allan G. M., Kennedy S., McNeilly F., Foster J. C., Ellis J. A., Krakowka S. J., Meehan B. M., Adair B. M.*: Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. J. Comp. Pathol. 1999, 121, 1-11.
2. *Allan G. M., McNeilly F., Ellis J., Krakowka S., Botner A., McCullough K., Nauwynck H., Kennedy S., Meehan B., Charreyre C.*: PMWS: experimental model and co-infections. Vet. Microbiol. 2004, 98, 165-168.
3. *Allan G. M., McNeilly F., Ellis J., Krakowka S., Meehan B., McNair I., Walker I., Kennedy S.*: Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus type 2 (PCV-2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV-2 replication. Arch. Virol. 2000, 145, 2421-2429.
4. *Chae C.*: Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. Vet. J. 2004, 168 (1), 41-49.
5. *Ellis J., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S., Allan G. M.*: Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. Vet. Microbiol. 2004, 98, 159-163.
6. *Fenaux M., Halbur P. G., Haqshenas G., Royer R., Thomas P., Nawagitgul P., Gill M., Toth T. E., Meng X. J.*: Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. J. Virol. 2002, 76 (2), 541-551.
7. *Gresham A., Allan G. M., McNeilly F., Kennedy S.*: Links between postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis nephropathy syndrome. Pig J. 2001, 155-159.
8. *Hasslung F., Wallgren P., Ladekjaer-Hansen A. S., Botner A., Nielsen J., Wattrang E., Allan G. M., McNeilly F., Ellis J., Timmusk S., Belak K., Segall T., Melin L., Berg M., Fossum C.*: Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. Vet. Microbiol. 2005, 106 (1-2), 49-60.
9. *Harding J. C. S.*: The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. Vet. Microbiol. 2004, 98, 131-135.
10. *Harms P. A., Sorden S. D., Halbur P. G., Bolin S. R., Lager K. M., Morozov I., Paul P. S.*: Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with the 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Pathol. 2001, 38, 528-539.
11. *Kennedy S., Moffett D., McNeilly F., Meehan B., Ellis J., Krakowka S., Allan G. M.*: Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine parvovirus. J. Comp. Pathol. 2000, 122, 9-24.
12. *Kim J., Chung H.-K., Chae C.*: Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. Vet. J. 2003, 166 (3), 251-256.
13. *Krakowka S., Ellis J., McNeilly F., Ringler S., Rings D. M., Allan G.*: Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with PCV2. Vet. Pathol. 2001, 38, 31-42.
14. *Krakowka S., Ellis J. A., Meehan B., Kennedy S., McNeilly F., Allan G.*: Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. Vet. Pathol. 2000, 37, 254-263.
15. *Kyriakis S. C., Saoulidis K., Lekkas S., Miliotis Ch. C., Papoutsis P. A., Kennedy S.*: The Effects of Immuno-modulation on the Clinical and Pathological Expression of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. J. Comp. Path. 2001, 126, 38-46.
16. *Ladekjaer-Mikkelsen A.-S., Nielsen J., Stadejek T., Storgaard T., Krakowka S., Ellis J., McNeilly F., Allan G., Botner A.*: Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). Vet. Microbiol. 2002, 89, 97-114.
17. *Meehan B. M., McNeilly F., McNair I., McNair I., Walker I., Ellis J. A., Krakowka S., Allan G. M.*: Isolation and characterisation of porcine circovirus 2 from cases of sow abortions and porcine dermatitis and nephropathy syndrome Arch. Virol. 2001, 146, 1-8.
18. *Pejsak Z., Kołodziejczyk P., Kozaczyński W., Stadejek T., Lipowski A., Roszkowski J.*: Przypadek zespołu skórno-nerkowego w wielkotowarowej fermie świń. Medycyna Wet. 2001, 57, 591-594.
19. *Quintana J., Segalés J., Rosell C., Casamiglia M., Rodríguez-Arrioja G. M., Chianini F., Folch M., Maldonado J., Canal M., Plana-Durán J.*: Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Vet. Rec. 2001, 149, 357-361.
20. *Rodríguez-Arrioja G. M., Ségales J., Balasch M., Rosell C., Quintana J., Folch J. M., Plana-Durán J., Mankertz A., Domingo M.*: Serum antibodies to porcine circovirus type 1 nad type 2 in pigs with and without PMWS. Vet. Rec. 2000, 146, 762-764.
21. *Rosell C., Segales J., Ramos-Vara J. A., Folch J. M., Rodriguez-Arrioja G. M., Duran C. O., Balash M., Plana-Duran J., Domingo M.*: Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Vet. Rec. 2000, 146, 40-43.
22. *Rosell C., Segalés J., Plana-Durán J., Balasch M., Rodríguez-Arrioja G. M., Kennedy S., Alan G. M., McNeilly F., Latimer K. S., Domingo M.*: Pathological, Immunohistochemical, and In-situ Hybridization Studies of Natural Cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Pigs. J. Comp. Path. 1999, 120, 59-78.
23. *Rovira A., Balash M., Segalés J., García L., Plana-Durán J., Rosell C., Ellebrok H., Markentz A., Domingo M.*: Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. J. Virol. 2002, 76, 3232-3239.
24. *Segalés J.*: Praktyczne aspekty zwalczania PMWS. Suplement – Świnie. Mag. Wet. 2004, 42-44.
25. *Segalés J., Rosell C., Domingo M.*: Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. Veterinary Microbiology 2004, 98, 137-149.
26. *Stadejek T.*: Możliwości laboratoryjnego rozpoznawania poodsadzeniowego, wielonarządowego zespołu wyniszczającego świń. Suplement – Świnie, Mag. Wet. 2001, 76-78.
27. *Stadejek T.*: Znaczenie zakażeń cirkowirusem świń typ 2 (PCV-2). Medycyna Wet. 2002, 58, 492-496.
28. *Wellenberg G. J., Stockhofe-Zurwieden N., de Jong M. F., Boersma W. J., Elbers A. R.*: Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. Vet. Microbiol. 2004, 99 (3-4), 203-214.

Adres autora: doc. dr hab. Tomasz Stadejek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: stadejek@piwet.pulawy.pl