

CŪKU CIRKOVĪRUSA-2 IETEKME UZ MULTINUKLEĀRO GIGANTISKO ŠŪNU UN VIRUSĀLO IESLĒGUMA ĶERMENĪŠU PARĀDĪŠANOS CŪKU LIMFMEZGLOS

PORCINE CIRCOVIRUS-2 IMPACT ON THE MULTINUCLEAR GIANT CELLS AND VIRUS INCLUSION BODIES APPEARANCES IN PIGS LYMPH NODES

Inga Piginka¹, **Edīte Birģele**²

¹Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts „BIOR”, Patoloģijas nodaļa, Latvija

²LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Preklīniskais Institūts, Latvija

¹Pathology division, Institute of Food Safety, Animal Health and Environment - “BIOR”, Latvia

²LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Preclinical Institute, Latvia
piginka@inbox.lv

ABSTRACT

Porcine circovirus-2 is widespread infection and cause Postweanig Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), which clinical signs and gross lesions are variable and non-specific (Harding, 2004). However, microscopic lesions in lymphoid tissues are almost unique and constitute the basis of PMWS diagnosis (Segales et al., 2004a). Therefore research of lymph node specific lesion can help to understand the pathogenesis of the PMWS, and useful in the routine examinations for pigs possible infected by PCV2. The aim of study was to investigate porcine circovirus-2 (PCV2) impact on the multinuclear giant cells and virus inclusion bodies appearances in pig lymph nodes. The research was carried out in 2010. Thirty pigs, 5 - 15 weeks old, were selected from three Latvian farms for investigation. On their farms pigs with clinical signs of Postweanig Multisystemic Wasting Syndrome were observed. Generally, four lymph nodes were taken from each animal for histological and immunohistochemical investigations. As a result, multinuclear giant cells were detected in 31.1% of lymph nodes, including lymph nodes with mostly mild amount of PCV2 antigen. Interrelation was detected between the virus amount in the lymph node and intensity of changes in some structure of lymph node: increasing amount of virus in the lymph node, then increase the intensity of structural change - regardless of multinuclear giant cells presence in the lymph nodes. PCV2 intracytoplasmic inclusion bodies were observed in 20.3% of PCV2 positive lymph nodes, furthermore there lymph nodes had moderate and severe amount of PCV2 antigen, as well had moderate and severe changes in lymph nodes structure.

KEY WORDS: multinuclear giant cell, intracytoplasmic inclusion bodies, porcine circovirus-2, lymph nodes.

IEVADS

Ar cūku cirkovīrusa-2 (PCV2) inficētiem sivēniem novēro tā saucamo sistēmisko limfadenopātiju, zem šī nosaukuma saprotot dažādas limfoido audu reakcijas – piemēram, ingvinālo, mezenteriālo un bronhiālo limfmezglu palielināšanos (Segales et al, 1997; Allan et al., 2000; Harding, 2004). PCV2 ietekme uz cūku imūnsistēmu pilnībā vēl nav noskaidrota. Kaut gan ir parādīts, ka galvenās PCV2 replikācijas šūnas ir monocīti un makrofāgi (Rosell et al., 1999).

Konkrētas limfoīdo audu izmaiņas cūkām ar PCV2 var konstatēt tikai ar histoloģiskās izmeklēšanas metodēm. Literatūrā atzīmēts, ka šādiem dzīvniekiem limfmezglu histoloģiskās izmaiņas izpaužas kā folikulu vizuālās izmaiņas, limfocītu zudums, histiocītu proliferācija (Rosell et al., 1999; Segales et al., 2004; Opriessnig et al., 2007). Turklāt iespējama limfoīdo audu reaktivitātes atšķirības dažādu šķirņu cūkām (Opriessnig et al., 2009). Atsevišķos gadījumos limfmezglos konstatē tā saucamas multinukleārās gigantiskās šūnas, kā arī bazofīlos virusālos ieslēguma ķermenīšus parādīšanos histiocītu un makrofāgu citoplazmā (Rosell et al., 1999; Segales et al., 2004b; Opriessnig et al., 2007). Mūsu **darba mērķis** bija izpētīt PCV2 ietekmi uz multinukleāro gigantisko šūnu (MGŠ) un virusālo ieslēguma ķermenīšus parādīšanos cūku limfmezglos. **Darba uzdevumi:**

1. izpētīt MGŠ un PCV2 virusālo ieslēguma ķermeņu sastopamību cūku limfmezglos – *lnn. inguinales superficiales sinister et dexter, lnn. mesenterici craniale* un *lnn. tracheobronchales*;
2. izpētīt atsevišķo struktūru morfoloģiskās izmaiņas limfmezglos, kuros konstatēti ar MGŠ un PCV2 virusālie ieslēguma ķermeņi;
3. izvērtēt cūku cirkovīrusa-2 daudzuma ietekmi uz MGŠ un virusālo ieslēguma ķermeņu parādīšanos attiecīgajos limfmezglos.

MATERIĀLS UN METODIKA

Izmeklējumi veikti 2010. gadā trīs cūkkopības saimniecībās Latvijā (Latgales un Kurzemes reģionā). Visās saimniecībās sivēniem klīniski bija novērota tā saucamās cūku pēcatšķiršanas novājšēšanas sindromam (PMWS) līdzīga aina un sivēnu krišana. Pirms nobeigšanās sivēniem novēroja svāra zudumu, caureju vai respiratoras saslimšanas, gļotādu bālumu vai ikteriskumu, kas atbilst literatūrā aprakstītajai PMWS klīniskajai aintai (Clark, 1997, Rosell et al., 1999, Segales et al., 2004a). Pētījumam katrā saimniecībā atlasījām desmit 5 - 15 nedēļu vecus nobeigušos sivēnus. Divpadsmit stundu laikā pēc sivēnu nāves veicām sekciju, paņēmām limfmezglos – *lnn. inguinales superficiales sinister et dexter, lnn. mesenterici craniale* un *lnn. tracheobronchales* histoloģiskai un imunohistoķīmiskai izmeklēšanai. Kopumā no katra dzīvnieka (n=30) histoloģiskai un imunohistoķīmiskai izmeklēšanai paņemti četri limfmezgli.

Visu dzīvnieku limfmezglos (n=120) histoloģiskai un imunohistoķīmiskai izmeklēšanai fiksējām 10% neitrālā formalīnā. Parafīnā ieguldītie preparāti tika sagriezti 4 μm biezos griezumos. Tālāk daļu preparātus, attiecīgi apstrādātus un krāsotus ar hematoksilīnu un eozīnu. Imunohistoķīmiskai izmeklēšanai uz specifisko PCV2 antigēnu klātbūtni izmantojām avidīna-biotīna-peroksidāzes tehniku (Szczotka et al., 2011) ar primāru monoklonālu antivielu Ingenasa 36A9 (atšķaidījums 1:250 ar TBS un albumīnu). Preparātus analizējām Zeissa gaismas mikroskopā. Katrā histoloģiskajā preparātā novērtējām multinukleāro gigantisku šūnu un PCV2 citoplazmatisko ieslēguma ķermeņu klātbūtni dažādās limfmezgla struktūrās: kortikālajā, parakortikālajā, un medulārājā slānī, kā arī subkapsulāros un trabekulāros sinusos. Katrā limfmezgla reģionā izmeklējām 10 redzeslaukus ar palielinājumu x200.

Katrā histoloģiskajā preparātā novērtējām trīs limfmezgla struktūras parametrus, kuru izmaiņas ir vispārpieņemts izteikt ballēs no 0 līdz 3 (Opriessing et al., 2004):

- folikulu vizuālais izskats (0 – izmaiņu nav, 1 – folikulu vizuālais izskats nedaudz izplūdis, 2 – folikulu struktūra vāji saskatāma, 3 – folikuli vispār nav saskatāmi);
- limfocītu daudzuma samazināšanās limfmezglā kopumā (0 – izmaiņu nav, 1 – limfocītu daudzums nedaudz samazināts, 2 – limfocītu daudzums vidēji samazināts, 3 – novēro ļoti lielu limfocītu zudumu);
- histiocītu daudzums (0 – histiocītu preparātā nav, 1 – konstatētas atsevišķas šūnas, 2 – vidēji daudz histiocītu, 3 – histiocīti ļoti daudz).

Katrā imunohistoķīmiskajā preparātā novērtējām PCV2 antigēna daudzumu, kas attiecīgi norādīja uz PCV2 daudzumu. Izvērtējumu veicām pēc vispārpieņemtās sistēmas, kurā PCV2 antigēna daudzums izvērtēts kā neliels (+), vidējs (++) un liels (+++) (Opriessing et al., 2004).

Datu statistiskā apstrāde veikta ar Microsoft Excel t-test: Two-Sample Assuming Unequal Variance, savstarpēji salīdzinot atsevišķo parametru izmaiņu vidējos rādītājus limfmezgliem ar MGŠ klātbūtni un bez tās ($p < 0,05$), kā arī savstarpēji salīdzinot atsevišķo parametru izmaiņu vidējos rādītājus limfmezgliem ar PCV2 citoplazmatisko ieslēguma ķermeņu klātbūtni un bez tās ($p < 0,05$).

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

No 30 imunohistoķīmiski izmeklētiem sivēniem PCV2 antigēnu konstatējām 16 dzīvnieku limfmezglos, turklāt tas dažādos daudzumos bija konstatēts visos 64 izmeklētajos limfmezglos (53,3%). Jāatzīmē, ka sivēnu limfmezglos negatīvos uz PCV2 antigēnu, MGŠ un PCV2 vīrusa citoplazmatiskus ieslēguma ķermeņus nekonstatējām.

Tā kā vienam dzīvniekam izmeklētajos limfmezglos varēja konstatēt PCV2 antigēnu dažādos daudzumos (no + līdz +++), tad turpmākajai analīzei sagrupējām limfmezgļus trīs grupās – attiecīgi pēc vīrusa antigēna daudzuma tajos.

Pirmo analizēsīm saistību starp PCV2 daudzumu limfmezglos un MGŠ parādīšanos tajos (1.tabula). Kopumā MGŠ noteicām 31,3% limfmezglos. Citu autoru pētījumos MGŠ parādīšanās limfmezglos bija novērojama 27,1% (Segales et al., 2002) un 21,2% (Krakowka et al., 2005) gadījumos. Visbiežāk MGŠ sastapām limfmezglos (60%) ar nelielu (+) PCV2 antigēna daudzumu tajos.

1. tabula / Table 1

Limfmezglu skaits ar multinukleārās gigantiskās šūnas
Amount of lymph nodes with multinuclear giant cells (MGC)

MGS limfmezglos: MGC in lymph nodes:	Kopā PCV2 antigēna pozitīvie limfmezgli (n=64) Total amount of PCV2 antigen positive lymph nodes (n=64)	PCV2 antigēna daudzums Amount of PCV2 antigen		
		+	++	+++
Konstatētas / Detected	20 (31,3 %)	12 (60%)	4 (20%)	4 (20%)
Nav konstatētas / Not detected	44 (68,7 %)	21 (48%)	12 (27%)	11 (25%)

Multinukleārās gigantiskās šūnas ir lieli makrofāgi, kuri rodas no makrofāgu savstarpējas saplūšanas (Möst J. et al., 1997, Cheville N.F., 1999). Parasti MGŠ audos parādās gadījumos, ja nepieciešams fagocitēt liela izmēra antigēnu (Möst J. et al., 1997). Zinot, ka PCV2 vairojas makrofāgos, iespējams, inficētos makrofāgus organisms sāk uztvert kā antigēnu, kuru nepieciešams fagocitēt, ko veic jau citi makrofāgi, rezultātā veidojot MGŠ (Tsai YC et al., 2010).

Darba gaitā mēģinājām atbildēt uz jautājums, vai ir kādas raksturīgas strukturālas izmaiņas tajos limfmezglos, kuros varēja novērot multinukleāro gigantisko šūnu parādīšanos (2.tabula).

Vidējais novērtēšanas rādītājs (ballēs) limfmezgliem ar multinukleārām gigantiskām šūnām (n=20) un bez tām (n=44)
Average structural changes of lymph nodes (scores) with multinuclear giant cells[^] (n=20) and without them (n=44)

PCV2 antigēna daudzums Amount of PCV2 antigen	Novērtēšanas parametri Evaluated parameters					
	Folikulu vizuālais izskats / Visualization of the follicle structure		Limfocītu daudzuma samazināšanās / Decrease amount of lymphocytes		Histiocītu daudzuma palielināšanās / Increase amount of histiocytes	
	bez MGŠ without MGC [^]	ar MGŠ with MGC [^]	bez MGŠ without MGC [^]	ar MGŠ with MGC [^]	bez MGŠ without MGC [^]	ar MGŠ with MGC [^]
+	1,5*	2,2*	1,2	1,6	1,3	1,4
++	2,7	3,0	2,1	2,3	1,6	1,5
+++	3,0	3,0	2,7	2,8	2,4	2,0

* - $p < 0,05$ ir būtiskas atšķirības

* - $p < 0,05$ is detected significant difference

Limfmezglos, kuros bija neliels (+) PCV2 daudzums novēroja statistiski būtiskās atšķirības ($p < 0,05$) folikulu vizualizācijā limfmezglos ar MGŠ un bez tām. Limfmezglos, kuros konstatējām multinukleārās gigantiskās šūnas folikulu struktūra bija vājāk saskatāma. Konstatējām, zināmu sakarību starp vīrusa daudzumu limfmezglā, no vienas puses, un atsevišķo struktūru izmaiņu intensitāti, no otras: palielinoties vīrusa daudzumam attiecīgajā limfmezglā, palielinās strukturālo izmaiņu intensitāte – neatkarīgi no MGŠ klātbūtnes attiecīgajā limfmezglā (sk. 2.tabulu).

Nākošais jautājums, kas jānoskaidro bija – tieši kur pārsvarā lokalizējās multinukleārās gigantiskās šūnas limfmezglos ar dažādu cirkovīrusa-2 daudzumu. Rezultāti atspoguļoti trešajā tabulā. Konstatējām, ka limfmezglos ar nelielu (+) PCV2 daudzumu MGŠ biežāk lokalizējās kortikālajā slānī, turklāt tieši folikulos. Toties limfmezglos ar lielu (+++) PCV2 daudzumu, MGŠ vairāk novērojām parakortikālajā slānī (3.tabula).

Pieaugot PCV2 antigēna daudzumam cūku limfmezglos, visstiprāk izmainās limfmezglu folikulu struktūra – tie sāk sliktāk vizualizēties, līdz pat mikroskopā kļūst pilnīgi nesaskatāmi (Pigiņka et Birģele, 2012). Uzskatām, ka pie liela (+++) PCV2 daudzuma limfmezglos folikuls parasti sabrūk, un MGŠ nokļūst parakortikālajā slānī, tādēļ arī tieši šajā slānī tās pārsvarā konstatējām.

Tālāk limfmezglos ar dažādu PCV2 antigēna daudzumu analizēsim PCV2 vīrusa citoplazmatiskos ieslēguma ķermenīšus (4. tabula). PCV2 citoplazmatiskos ieslēguma ķermenīšus konstatējām 20,3% no izmeklētajiem limfmezgliem. Tas ir ievērojami mazāk, nekā konstatēts citus autoru pētījumos, kur šis skaitlis sasniedz 33,3% (Krakowka et al., 2005) un pat 34,0% (Segales et al, 2002). Jādomā, ka šīs atšķirības varētu būt saistītas ar pētījumos iekļauto cūku dažādajām šķirnēm. Kā jau raksta ievadā minējām, atšķirīgu šķirņu cūku limfoīdo audu reakciju uz cirkovīrusu-2 var būt dažāda (Opriessnig et al., 2009).

MGŠ skaits dažādos limfmezgla reģionos atkarība no PCV2 antigēna daudzuma tajā
Amount of multinuclear giant cells[^] in difference regions of lymph nodes according with
PCV2 antigen in there lymph nodes

MGŠ lokalizācija limfmezglā MGC [^] location in lymph nodes	PCV2 antigēna daudzums limfmezglos Amount of PCV2 antigen in lymph nodes					
	+ (n=12)		++ (n=4)		+++ (n=4)	
	Limfmezgli Lymph nodes	MGŠ* MGC* [^]	Limfmezgli Lymph nodes	MGŠ* MGC* [^]	Limfmezgli Lymph nodes	MGŠ* MGC* [^]
Kortikālajā slānī Cortex	8	1-11	3	5	2	2-8
Parakortikālajā slānī Paracortex	4	1	1	2	3	1-12
Medulārajā slānī Medulla	-	-	-	-	-	-
Trabekulārajā sīnusā Trabecular sinuss	2	1-2	-	-	2	1
Subkapsulārajā sīnusā Subcapsular sinuss	-	-	1	1	-	-

* - minimālais un maksimālais MGŠ skaits limfmezgla attiecīgajā struktūrā 10 redzeslaukos (palielinājums x200).

* - minimal and maximal amount of multinuclear giant cells in appurtenant region of lymph nodes from 10 field (magnification x200).

Limfmezglu skaits ar PCV2 citoplazmatiskiem ieslēguma ķermeņiem
Amount of lymph nodes with PCV2 intracytoplasmic inclusion bodies

PCV2 citoplazmatiski ieslēguma ķermeņi limfmezglos: PCV2 intracytoplasmic inclusion bodies in lymph nodes:	PCV2 antigēna daudzums Amount of PCV2 antigen			Kopā PCV2 antigēna pozitīvos limfmezglos (n=64) Total amount of PCV2 antigen positive lymph nodes
	+	++	+++	
Konstatēti / Detected	0	5	8	13 (20,3 %)
Nav konstatēti / Not detected	33	11	7	51 (79,7 %)

Jāuzsver, ka vīrusa ieslēgumus konstatējām tikai tajos limfmezglos, kuros PCV2 antigēna daudzums bija vidēji liels vai liels (skat.4.tabulu), līdz ar to visu limfmezglu struktūru izmaiņas bija 2 vai 3 ballu līmenī (5. tabula).

Vidēji lielais un lielais PCV2 daudzums limfmezglos predisponēja, gan histiocītu daudzuma palielināšanos (vidēji līdz 2,2 ballēm), gan vienlaicīgi arī PCV2 ieslēguma ķermeņišu parādīšanos. Zinot, ka histiocīti ir „novecojušie” makrofāgi (Willard-Mack, 2006), bet PCV2 organismā vairojas tieši makrofāgos (Rosell et al., 1999), tad jādome, ka palielināts

PCV2 daudzums izraisīja limfmezgla atbildes reakciju, kurā zināma mērā atspoguļojas makrofāgu „cīņā” ar konkrēto vīrusu.

5. tabula / Table 5

Limfmezglu struktūru izmaiņas ballēs (vidējie rādītāji) limfmezglos bez (n=51) un ar (n=13) PCV2 citoplazmatiskiem ieslēguma ķermeņiem
Average structural changes of lymph nodes (scores) without PCV2 intracytoplasmic inclusion bodies (n=51) and without them (n=13)

PCV2 antigēna daudzums Amount of PCV2 antigen	Novērtēšanas parametri Evaluated parameters					
	Folikulu vizuālais izskats / Visualization of the follicle structure		Limfocītu daudzuma samazināšanās / Decrease amount of lymphocytes		Histiocītu daudzuma palielināšanās / Increase amount of histiocytes	
	Bez PCV2 ieslēguma ķermeņiem Without PCV2 inclusion bodies	Ar PCV2 ieslēguma ķermeņiem With PCV2 inclusion bodies	Bez PCV2 ieslēguma ķermeņiem Without PCV2 inclusion bodies	Ar PCV2 ieslēguma ķermeņiem With PCV2 inclusion bodies	Bez PCV2 ieslēguma ķermeņiem Without PCV2 inclusion bodies	Ar PCV2 ieslēguma ķermeņiem With PCV2 inclusion bodies
+	1,8	-	1,5	-	1,5	-
++	2,7	3,0	2,3	2,2	1,6*	2,2*
+++	3	3,0	2,7	2,6	2,3	2,4

*- p<0,05 ir būtiskas atšķirības

* - p<0,05 is detected significant difference

SECINĀJUMI

1. Multinukleārās gigantiskās šūnas sastopamas 31,3% limfmezglos, turklāt tajos kas pārsvarā ir ar nelielu PCV2 antigēna daudzumu.
2. Konstatējām, zināmu sakarību starp vīrusa daudzumu limfmezglā, no vienas puses, un atsevišķo struktūru izmaiņu intensitāti, no otras: palielinoties vīrusa daudzumam attiecīgajā limfmezglā, palielinās strukturālo izmaiņu intensitāte – neatkarīgi no MGS klātbūtnes attiecīgajā limfmezglā.
3. PCV2 vīrusa citoplazmatiskie ieslēguma ķermeņi limfmezglos konstatēti tikai 20,3% gadījumos, pie tam tajos limfmezglos, kur PCV2 antigēna daudzums ir vidēji liels vai liels, kas savukārt noteica, ka visu šo limfmezglu struktūru izmaiņas arī bija 2-3 ballu līmenī, tas ir vidēji lielas vai lielas.

LITERATŪRA

1. Allan, G.M., Ellis, J.A. Porcine circovirus: a review. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2000; 12: 3 - 14.
2. Harding, J.C. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. Veterinary Microbiology. 2004; 98: 131 - 135.
3. Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Waldner, C., Allan, G. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2005; 17: 213 - 222.

4. Möst, J., Spötl, L., Mayr, G., Gasser, A., Sarti, A., Dierich, M.P. Formation of multinucleated giant cells in vitro is dependent on the stage of monocyte to macrophage maturation. *Journal of Blood*. 1997; 89: 662 - 671.
5. Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2007; 19: 591 - 615.
6. Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J.K., Juhan, N. M., Meng, X.J., Halbur, P.G. Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *Journal of Animal Science*. 2009; 87: 1582 - 1590.
7. Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.-J., Halbur, P.G. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology*. 2004; 41: 624 – 640.
8. Pigiñka, I., Birgele, E. Porcine circovirus-2 impact on the morphological sight of pig lymph nodes. *Research for Rural Development: Annual 18th International S.* in process. 2012.
9. Rosell, C., Segales, J., Plana-Durañ, J., Balasch, M., Rodríguez-Arrijoja, G.M., Kennedy, S., Allan, 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. *Journal of Comparative Pathology*. 1999; 120: 59 – 78.
10. Segales, J., Calsamiglia, M., Rosell, C., Soler, M., Maldonado, J., Martin, M., Domingo, M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Veterinary Microbiology*. 2002; 85: 23 - 30.
11. Segales, J., Domingo, M., Chianini, F., Majo, N., Dominguez, J., Darwich, L., Mateu, E. Immunosuppression in post-wearing multisystemic syndrome affected pigs. *Veterinary Microbiology*. 2004a; 98: 151 - 158.
12. Segales, J., Rosell, C., Domingo, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Veterinary Microbiology*. 2004b; 98: 137 - 149.
13. Segales, J., Sitjar, M., Domingo, M., Dee, S., DelPozo, M., Noval, R., Sacristan, C., DeLasHeras, A., Ferro, A., Latimer, K.S. First report of post-weaning multisystemic syndrome in pigs in Spain. *Veterinary Record*. 1997; 141: 600 - 601.
14. Szczotka, A., Stadejek, T., Pejsak, Z. A comparison of immunohistochemistry and *in situ* hybridization for the detection of porcine circovirus type 2 in pigs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2011; 14: 565 - 571.
15. Tsai, Y.C., Jeng, C.R., Hsiao, S.H., Chang, H.W., Liu, J.J., Chang, C.C., Lin, C.M., Chia, M.Y., Pang, V.F. Porcine circovirus type 2 (PCV2) induces cell proliferation, fusion, and chemokine expression in swine monocytic cells in vitro. *Journal of Veterinary Research*. 2010; 41: 60 - 65.
16. Willard-Mack, C.L. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Journal of Toxicologic Pathology*. 2006; 34: 409 – 424.